



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

LUCIANO RODOLFO FERREIRA DE LUCENA

**INOVAÇÕES EM BIODOSIMETRIA: EXTENSÃO DO TEMPO DE CULTURA E
MICRONÚCLEOS NA AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Recife
2025

LUCIANO RODOLFO FERREIRA DE LUCENA

**INOVAÇÕES EM BIODOSIMETRIA: EXTENSÃO DO TEMPO DE CULTURA E
MICRONÚCLEOS NA AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências. Área de concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear

Orientador: Prof. Dr. Ademir Amaral

Coorientador: Prof. Dr. André Maciel Netto

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lucena, Luciano Rodolfo Ferreira de.

Inovações em Biodosimetria: extensão do tempo de cultura e micronúcleos na avaliação da radiosensibilidade de pacientes com câncer de próstata / Luciano Rodolfo Ferreira de Lucena. - Recife, 2025.

62f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologias e Geociências, Programa de Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2025.

Orientação: Ademir de Jesus Amaral.

Coorientação: André Maciel Netto.

Inclui referências.

1. Radiossensibilidade individual; 2. Citogenética; 3. Biodosimetria; 4. Linfócitos; 5. Toxicidade radioinduzida; 6. Métodos preditivos. I. Amaral, Ademir de Jesus. II. Maciel Netto, André. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

LUCIANO RODOLFO FERREIRA DE LUCENA

**INOVAÇÕES EM BIODOSIMETRIA: EXTENSÃO DO TEMPO DE CULTURA E
MICRONÚCLEOS NA AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Tese Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências - CTG, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: DOSIMETRIA E INSTRUMENTAÇÃO NUCLEAR.

Aprovado em: 14/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ademir de Jesus Amaral (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Edvane Borges da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Simey de Souza Leão Pereira Magnata (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Fábio Tonissi Moroni (Examinador Externo)
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

AGRADECIMENTOS

Expresso minha profunda gratidão aos professores Ademir Amaral e André Maciel, cuja orientação, apoio, estímulos e bom humor foram fundamentais em todas as etapas desta pesquisa.

Estendo meu reconhecimento aos professores Isvânia Lopes, Fábio Moroni, Thiago Salazar e Ana Melo, pela disponibilidade em participar da banca de defesa e pelas relevantes contribuições à versão final desta tese.

Agradeço às professoras Simey Magnata, Edvane Silva e Marcela Moura pelas valiosas contribuições durante as duas bancas de seminário, assim como pelo apoio indispensável nas discussões que nortearam o desenvolvimento deste trabalho.

Aos mestrandos do LAMBDA, Ianka Lacerda, João Oliveira e Giovanna Siqueira, sou grato pela amizade e pelas significativas contribuições ao desenvolvimento do projeto, especialmente na parte laboratorial.

Ao Dr. David Lloyd, registro meu agradecimento pela leitura crítica e pelas sugestões fundamentais para a melhoria do artigo publicado.

Ao Dr. Jonathan Azevedo, expresso minha gratidão pela indispensável parceria e pela colaboração na indicação e avaliação dos pacientes.

A minha mãe, Alda Ferreira, dedico um especial reconhecimento pelo seu carinho e exemplo de dedicação, além do seu apoio constante ao meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade de Pernambuco, ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz e aos funcionários do setor de Radioterapia, agradeço pela imprescindível cooperação e pela cessão da estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao PROTEN, registro minha gratidão pela disponibilização de infraestrutura e pelo suporte financeiro, essenciais à realização deste trabalho.

À Agência Internacional de Energia Atômica, agradeço pelo financiamento e por promover a troca de ideias entre diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo.

Ao CNPq, manifesto meu reconhecimento pelo apoio financeiro a esta pesquisa e a outros projetos em nosso laboratório.

Por fim, a todos os amigos que, de maneira direta ou indireta, me auxiliaram nesta longa jornada de doutoramento, deixo meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

A dosimetria citogenética tem sido utilizada como complementar ou alternativa à dosimetria física na avaliação da dose individual absorvida em cenários que vão do monitoramento ocupacional aos incidentes radioativos. Nessas avaliações, os bioindicadores de referência são os cromossomos dicêntricos e os micronúcleos (MN) contabilizados a partir de linfócitos em amostras de sangue periférico. O uso destes biomarcadores na avaliação da radiosensibilidade individual, por outro lado, é um campo de investigação recente com potencial de permitir ajustes personalizados nos protocolos de radioterapia e a redução de efeitos colaterais, mas que ainda precisa de adaptações metodológicas e mais estudos para ser validado. Neste contexto, esta pesquisa investigou: (i) a influência do tempo de cultivo de linfócitos no Índice Mitótico, na frequência de células em primeira divisão e na estimativa de dose após irradiação de amostras de sangue com diferentes doses; e (ii) o uso do ensaio de MN na predição da radiosensibilidade individual em pacientes com câncer de próstata encaminhados à radioterapia. Na primeira investigação, amostras de sangue de voluntários saudáveis foram irradiadas com doses de 3, 5 ou 6 Gy de ^{60}Co (1,48 kGy/h) e cultivadas *in vitro* por 48, 56, 68 e 72 horas. Após fixação e coloração com FPG, as células foram analisadas em microscópio óptico. Observou-se aumento de até 12 vezes no índice mitótico e de até 10 vezes na frequência de células em primeira divisão com a extensão do tempo de cultivo, especialmente em doses elevadas (5 e 6 Gy) e cultivo por 72 horas. A estimativa de dose foi consistente com a dose irradiada, variando até +0,3 Gy. Essa adaptação metodológica mostrou-se vantajosa para a biodosimetria, particularmente em cenários de altas doses e análise de radiosensibilidade. Para o estudo de radiosensibilidade de pacientes com câncer de próstata, amostras de sangue foram previamente irradiadas com 2,5 ou 4 Gy em acelerador linear de 6 MV (0,12 kGy/h) e cultivadas por 72 horas. Após fixação e coloração com Giemsa, as células foram analisadas em microscópio óptico. Constatou-se correlação entre as frequências de micronúcleos em linfócitos irradiados com 2,5 e 4 Gy e os sintomas gastrointestinais identificados na metade do tratamento. Para sintomas geniturinários, a correlação foi observada com a dose de 2,5 Gy na metade e no final do tratamento. Esses resultados indicam o potencial do ensaio de

micronúcleos como preditor de radiosensibilidade de pacientes com câncer de próstata encaminhados para a radioterapia.

Palavras-chave: radiosensibilidade individual, citogenética, biodosimetria, linfócitos, toxicidade radioinduzida, métodos preditivos.

ABSTRACT

Cytogenetic dosimetry has been used as a complementary or alternative approach to physical dosimetry for assessing the individual absorbed dose in scenarios ranging from occupational monitoring to radiological incidents. In these evaluations, the reference bioindicators are chromosomal aberrations (CA) and micronuclei (MN), quantified from lymphocytes in peripheral blood samples. The use of these biomarkers to assess individual radiosensitivity, on the other hand, is a relatively recent field of investigation with the potential to enable personalized adjustments in radiotherapy protocols and reduce side effects. However, methodological adaptations and further studies are still required to validate this approach. In this context, this research investigated: (i) the influence of lymphocyte culture time on the mitotic index, the frequency of first-division cells, and the dose estimation after irradiation of blood samples with different doses; and (ii) the use of the MN assay for predicting individual radiosensitivity in prostate cancer patients undergoing radiotherapy. In the first investigation, blood samples from healthy volunteers were irradiated with doses of 3, 5, or 6 Gy of ^{60}Co (1.48 kGy/h) and cultured in vitro for 48, 56, 68, and 72 hours. After fixation and staining with FPG, cells were analyzed using an optical microscope. An increase of up to 12-fold in the mitotic index and up to 10-fold in the frequency of first-division cells was observed with extended culture time, particularly at higher doses (5 and 6 Gy) and after 72 hours of culture. The dose estimation was consistent with the irradiated dose, varying by up to +0.3 Gy. This methodological adaptation proved advantageous for biodosimetry, especially in high-dose scenarios and radiosensitivity analysis. For the radiosensitivity study in prostate cancer patients, blood samples were pre-irradiated with 2.5 or 4 Gy in a 6MV linear accelerator (0.12 kGy/h) and cultured for 72 hours. After fixation and Giemsa staining, cells were analyzed using an optical microscope. A correlation was observed between micronucleus frequencies in lymphocytes irradiated with 2.5 and 4 Gy and gastrointestinal symptoms assessed at the midpoint of the treatment. For genitourinary symptoms, a correlation was observed with the 2.5 Gy dose at both the midpoint and the end of treatment. These results indicate the potential of the micronucleus assay as a laboratory predictor of radiosensitivity in prostate cancer patients undergoing radiotherapy.

Keywords: individual radiosensitivity, cytogenetics, biodosimetry, lymphocytes, radiation-induced toxicity, predictive methods.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	9
2	EXTENDING CULTURE TIME TO IMPROVE MITOTIC INDEX FOR CYTOGENETIC DOSIMETRY	11
3	BIODOSIMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA RADIOSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA	31
3.1	INTRODUÇÃO	31
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.1	Perfil da pesquisa e aspectos éticos	34
3.2.2	Pacientes e tratamento radioterápico	35
3.2.3	Ensaio de micronúcleos	37
3.2.4	Análise estatística	40
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.4	CONCLUSÃO	48
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

Desde sua descoberta no século XIX, a radiação ionizante (RI) tem sido objeto de intensa pesquisa, resultando em avanços tecnológicos consideráveis e em uma vasta gama de aplicações. Seja na agricultura, na indústria ou na medicina, a RI desempenha um papel crucial, desde o controle de qualidade de alimentos até o diagnóstico e tratamento de doenças.

Um aspecto importante das RIs é sua interação com o DNA de células vivas, que pode resultar em aberrações cromossômicas e micronúcleos de maneira proporcional à dose recebida, podendo levar à morte celular. Duas importantes aplicações desse conhecimento sobre as RIs são (i) a avaliação da exposição de trabalhadores ou do público geral a essas radiações através de dosimetria biológica, e (ii) o controle de células indesejáveis (ex.: neoplasias malignas) com o uso de elevadas doses de radiação, que é a base da radioterapia.

A dosimetria biológica engloba metodologias de avaliação de dose de um indivíduo com base em marcadores biológicos induzidos pela RI, como as aberrações cromossômicas e os micronúcleos. Ela tem sido aplicada como uma alternativa à dosimetria física em situações envolvendo exposição acidental ou suspeita de exposição acidental. Além disso, as metodologias da dosimetria biológica têm sido estudadas na avaliação da radiosensibilidade de pacientes em tratamento radioterápico (Ferreira-Lucena *et al.*, 2024; Pinto; Santos; Amaral, 2010; Silva *et al.*, 2020).

Por sua vez, a oncologia é uma das áreas da medicina que mais se beneficia do uso das RIs, com o tratamento radioterápico respondendo por aproximadamente 50% dos tratamentos curativos contra o câncer (Ruysscher *et al.*, 2019). Devido a esta relevância, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para o aumento da eficácia da radioterapia, bem como para a redução dos efeitos adversos, objetivando uma melhor sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Uma dessas linhas de pesquisa envolve o estudo de biomarcadores que possam identificar o grau de radiosensibilidade dos pacientes, visando uma maior personalização dos tratamentos e preservação dos tecidos saudáveis adjacentes aos tumores.

Uma revisão recente de biomarcadores citogenéticos na predição de efeitos adversos da radioterapia mostrou que todos os estudos, em que houve um valor preditivo notável desses marcadores, utilizaram doses elevadas de radiação *ex vivo*: 6 Gy para aberrações cromossômicas e 2-4 Gy para micronúcleos (Vinnikov *et al.*, 2020). Visto que ainda há poucos estudos com micronúcleos na identificação de pacientes radiosensíveis no tratamento do câncer de próstata, que é o segundo em incidência entre homens no Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2022) e com dosimetria biológica em cenários de doses elevadas (acima de 4 Gy), o presente trabalho buscou:

- Investigar o emprego do ensaio de micronúcleos como ferramenta laboratorial de análise preditiva de radiosensibilidade individual de pacientes com câncer de próstata submetidos à radioterapia;
- Analisar os efeitos da extensão do tempo de cultivo de linfócitos no Índice Mitótico, frequência de células em primeira divisão e estimativa de dose após irradiar amostras de sangue com diferentes doses de radiação.

Neste cenário, o Capítulo 2 a seguir descreve os resultados preliminares de um estudo inovador sobre o uso do ensaio de micronúcleos como marcador preditivo de radiosensibilidade em pacientes com câncer de próstata submetidos à radioterapia, considerando as correlações observadas entre as frequências de micronúcleos e os efeitos adversos reportados. O Capítulo 3 sintetiza as principais contribuições da pesquisa, destacando seu impacto na biodosimetria e na personalização dos protocolos radioterápicos, além de apontar perspectivas para estudos futuros, com foco na melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos. Por fim, o Apêndice apresenta o artigo publicado na revista *International Journal of Radiation Biology* (Ferreira-Lucena *et al.*, 2024), que aborda os efeitos da extensão do tempo de cultivo de linfócitos na precisão da estimativa de doses elevadas (>4 Gy) por meio da análise da frequência de dicêntricos.

2. BIODOSIMETRIA PARA AVALIAÇÃO DA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

2.1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é uma das neoplasias malignas mais comuns em homens e uma grande causa de mortalidade por câncer no mundo, sendo o segundo em incidência e a quinta causa de morte entre pessoas do sexo masculino, embora haja bastante variação de acordo com a população (Attard *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2024). No Brasil, estima-se que entre 2023 e 2025 haverá 71.730 novos casos de CaP por ano, correspondendo a um risco de 67,86 casos novos por 100 mil homens (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

A radioterapia externa é uma das principais opções no tratamento curativo do CaP, seja sozinha ou em combinação com cirurgia e terapia hormonal (National Comprehensive Cancer Network, 2024; Rancati *et al.*, 2017). Nesse tratamento, a radiação é geralmente direcionada para todo o órgão devido à natureza multifocal da doença e à incapacidade de localizar com precisão todos os focos malignos através dos procedimentos de imagem (Greco *et al.*, 2019). A dose prescrita é normalmente aplicada ao longo de várias semanas em múltiplas sessões (frações), geralmente uma vez por dia, de segunda a sexta. Com doses diárias de 2,5 a 3 Gy e administradas em 20 a 28 frações, o tratamento dura de 4 a 6 semanas (Benjamin; Tree; Dearnaley, 2017; National Comprehensive Cancer Network, 2024).

O objetivo principal de um tratamento radioterápico é entregar uma alta dose de radiação ao tumor (energia por unidade de volume irradiado), produzindo danos irreversíveis ao DNA e causando a morte das células tumorais, enquanto mantém a dose abaixo do limite tolerável para as estruturas saudáveis do entorno. Desta forma, um importante fator limitante neste tratamento é a tolerância dos tecidos normais (Dal Pra; Souhami, 2016; Ree; Redalen, 2015).

A radioterapia da próstata sempre foi desafiadora devido à sua localização na pélvis, próxima a órgãos dos sistemas gastrointestinal e geniturinário (Kamran; Light; Efstathiou, 2019). Dentre os órgãos que podem ser afetados pela radiação devido à proximidade à próstata, estão: reto, uretra, bexiga, diafragma urogenital e feixes neurovasculares (Greco *et al.*, 2019).

Pacientes em tratamento radioterápico frequentemente apresentam efeitos adversos agudos, geralmente leves a moderados, dos quais se recuperam após o

término da terapia. Entretanto, em casos mais graves, esses efeitos podem levar à interrupção temporária do tratamento, comprometendo o cronograma e a eficácia da radioterapia. Além disso, efeitos agudos de maior severidade e duração podem influenciar o desenvolvimento de complicações tardias nos mesmos tecidos ou órgãos (Dörr, 2015; Landoni *et al.*, 2016; Ruyscher *et al.*, 2019).

É amplamente compreendido que a toxicidade radioinduzida é um problema multifatorial, dependente não apenas da dose recebida, mas também de diversos processos biológicos complexos nos tecidos irradiados em resposta ao dano celular (Rancati *et al.*, 2017). Os principais determinantes reconhecidos dessa toxicidade estão relacionados a fatores físicos (dose acumulada, taxa de dose, falta de homogeneidade da dose e volume do tratamento), ao tratamento (interações com outras modalidades como cirurgia, quimioterapia e terapia hormonal), ao paciente (idade, hemoglobina, tabagismo e comorbidades como diabetes e doenças vasculares), e a fatores genéticos (Advisory Group on Ionising Radiation, 2013; Cozzarini *et al.*, 2015; Fiorino *et al.*, 2009; Hamstra *et al.*, 2013; Landoni *et al.*, 2016).

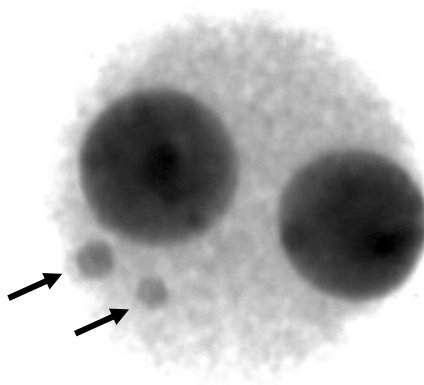
Sabe-se que por volta de 5-20% dos pacientes podem experimentar toxicidades severas em decorrência do tratamento radioterápico, tais como inflamações, infecções, ulcerações, fibrose, necrose, dermatite e retite. Embora essa porcentagem seja considerada aceitável pelos padrões médicos, esses pacientes podem enfrentar uma redução significativa na qualidade de vida, necessitar de medicamentos adicionais e/ou intervenções, além de suportar níveis intensos de dor (Brenques *et al.*, 2017; Foray; Bourguignon; Hamada, 2016). Ademais, essas toxicidades mais severas acabam por limitar os níveis de dose utilizados no tratamento de todos os pacientes, visto que os mais suscetíveis não são identificados previamente ao tratamento (Kerns *et al.*, 2023).

Estudar ferramentas capazes de identificar precocemente estes pacientes mais sensíveis é essencial, seja para oferecer um tratamento alternativo, se possível, seja para reduzir a exposição à radiação dos órgãos em risco (Brenques *et al.*, 2017; Granzotto *et al.*, 2016). Aspectos como escolha da estratégia terapêutica, dose prescrita, fracionamento, e uso de terapias de suporte podem ser bastante aprimorados em função dessa maior individualização do tratamento (Barnett *et al.*, 2015; Rancati *et al.*, 2017). A medicina personalizada ou de precisão é um objetivo de muitos pesquisadores clínicos e translacionais, cujo caminho passa pelo desenvolvimento de biomarcadores úteis para informar médicos e pacientes sobre

escolhas adequadas para o tratamento do câncer (Mohler *et al.*, 2019). Assim, diante de evidências de que variações na radiosensibilidade individual e fatores genéticos ou relacionados ao paciente podem ter papel importante no risco envolvendo as toxicidades causadas pela radioterapia, diversos estudos foram desenvolvidos buscando medir a radiosensibilidade individual para prever as toxicidades desenvolvidas por um paciente com câncer (Advisory Group on Ionising Radiation, 2013; Barnett *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020).

Os micronúcleos (Figura 1) são um tipo importante de marcador citogenético frequentemente usado no monitoramento de populações expostas à radiação. Eles são identificados como objetos esféricos distintos, separados no citoplasma das células filhas com a mesma morfologia do núcleo, porém em tamanho reduzido (Herate; Sabatier, 2020). A formação deles é feita pela deposição de uma membrana nuclear (separada do núcleo principal e frequentemente anormal) ao redor de cromossomos ou fragmentos cromossômicos retardatários que persistem na interfase após falharem em serem reintegrados a um núcleo primário ao fim da divisão celular (Krupina; Goginashvili; Cleveland, 2021).

Figura 1. Célula binucleada apresentando dois micronúcleos (setas)



Fonte: Silva *et al.* (2020).

Dentre as possíveis causas de formação de micronúcleos estão as lesões no DNA não reparadas ou reparadas incorretamente e a segregação errônea por conta de disfunções do aparato mitótico. A quebra cromossômica é um dos fatores preponderantes da formação dos micronúcleos, sendo os fragmentos acêntricos particularmente propensos à formação de micronúcleos pois são incapazes de formar ligações normais com o fuso mitótico (Guo *et al.*, 2019; Pinto; Santos; Amaral, 2010).

O ensaio de micronúcleos tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação e biomonitoramento de indivíduos e populações potencialmente expostas a agentes genotóxicos, tais como diferentes produtos químicos e radiação ionizante (Fenech *et al.*, 2020; Reimann; Stopper; Hintzsche, 2023). Comparado a outros métodos de dosimetria biológica, o ensaio de micronúcleos oferece vantagens significativas, como a simplicidade, a rapidez e o baixo custo. Além de identificar danos citogenéticos, ele permite estimar a dose de radiação, tornando-o uma ferramenta útil tanto em pesquisas como em situações de emergência (International Atomic Energy Agency, 2011; Pinto; Santos; Amaral, 2010).

A utilização de biomarcadores que apresentam um mecanismo dose-resposta à radiação ionizante em tratamentos como a radioterapia e em procedimentos radiológicos pode apresentar benefícios significativos. Devido à sua ligação com os danos ao DNA, esses marcadores poderiam permitir uma avaliação direta do risco de desenvolver complicações relacionadas à radiação, incluindo efeitos agudos e tardios (Vinnikov *et al.*, 2020). Nesse sentido, em estudos de radiosensibilidade com micronúcleos para a predição de efeitos adversos radioinduzidos em tecidos normais de pacientes em tratamento radioterápico, já foram encontradas correlações em alguns tipos de câncer, como próstata (Lee *et al.*, 2003), colo de útero (Silva *et al.*, 2020) e mama (Durdik *et al.*, 2023; Vandevoorde *et al.*, 2016). Contudo, ainda são necessárias mais pesquisas com marcadores citogenéticos, particularmente micronúcleos, para validar e estabelecer protocolos que possam ser utilizados na prática clínica.

Nesse contexto, o presente trabalho visou investigar o uso de micronúcleos como ferramenta laboratorial de análise preditiva da radiosensibilidade individual de pacientes encaminhados para o tratamento radioterápico do câncer de próstata.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Perfil da pesquisa e aspectos éticos

Esta foi uma pesquisa do tipo experimental analítica, resultado de uma colaboração entre o setor de radioterapia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) e o Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), localizado no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de

Pernambuco (DEN/UFPE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde - CCS/UFPE (parecer nº: 6.337.924).

Os participantes incluídos neste trabalho foram instruídos quanto à proposta do estudo e seus objetivos. Após esclarecimentos e concordância, os participantes atestaram sua inclusão na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.2.2. Pacientes e tratamento radioterápico

Os indivíduos analisados neste trabalho atenderam aos seguintes critérios:

Critérios para inclusão:

1. Adenocarcinoma restrito à próstata (T1-T2) ou se estendendo para a cápsula prostática (T3);
2. Sem evidências de disseminação do tumor além dos linfonodos regionais (M0);
3. Indicação ao tratamento radioterápico pela equipe médica do HUOC;
4. Concordância em participar da pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão:

1. Recusa ou desistência de participação a qualquer momento da realização da pesquisa;
2. Pacientes indicados ao tratamento quimioterápico pela equipe médica do HUOC;
3. Circunstâncias materiais, logísticas ou de outra natureza que impedissem o prosseguimento normal da investigação.

Os pacientes foram submetidos à radioterapia em acelerador linear com fótons de raio X de energia máxima de 6 MeV utilizando técnica conformacional 3D hipofracionada. O volume alvo clínico (*clinical target volume* – CTV), que representa a região tumoral e áreas que podem conter uma extensão microscópica da doença,

incluiu a próstata e as vesículas seminais ou, no caso dos indivíduos sem próstata, a loja prostática. O volume alvo planejado (*planning target volume* - PTV), que estabelece uma margem para compensar a variabilidade da configuração do tratamento e do movimento dos órgãos internos, foi de 4-10 mm ao redor do CTV, seguindo o protocolo executado por Lee *et al.* (2016).

O tratamento foi administrado ao PTV utilizando campos conformacionais tridimensionais moldados para preservar o máximo possível a bexiga e reto. Os arranjos de campo foram determinados pelo planejamento 3D, baseado em imagens de tomografia computadorizada da região pélvica, para produzir um plano conformacional ótimo, de acordo com as definições de volume. O plano de tratamento utilizado para cada paciente foi baseado em uma análise da dose volumétrica, incluindo análises de histograma de dose-volume (DVH) do PTV e das estruturas normais críticas (Lee *et al.*, 2016).

Os pacientes foram acompanhados ao longo do tratamento radioterápico para verificar o aparecimento de efeitos colaterais oriundos da radioterapia do CaP. Para tanto, os pacientes foram entrevistados pelo oncologista responsável pelos tratamentos em dois momentos: na metade e no final do tratamento. As doses acumuladas nesses dois momentos foram de, aproximadamente, 35 e 70 Gy. Foram atribuídas notas de 0 a 4 quanto à severidade desses efeitos, de acordo com a classificação de RTOG para efeitos agudos nos sistemas geniturinário e gastrointestinal (Tabela 1). De maneira geral, a toxicidade é graduada de 0 a 4 de acordo com a severidade do efeito: 0 (zero) representa nenhum efeito; 1, sintomas leves, sem necessidade de intervenção; 2, sintomas moderados que necessitam de intervenções locais, menores ou não invasivas; 3, sintomas severos ou medicamente significativos, mas que não representam um risco imediato à vida, para os quais hospitalização ou o prolongamento da hospitalização são indicados; e 4, sintomas que ameaçam a vida, para os quais são indicadas intervenções urgentes (Ruysscher *et al.*, 2019).

Tabela 1. Critérios de graduação da toxicidade aguda para os Sistemas Gastrointestinal Inferior e Geniturinário segundo RTOG.

Grau	Gastrointestinal inferior	Geniturinário
0	Sem alteração	Sem alteração
1	Frequência aumentada ou mudança na qualidade dos hábitos intestinais sem necessidade de medicamento / desconforto retal sem necessidade de analgésicos	Frequência de micção ou noctúria duas vezes o habitual / disúria no pré-tratamento, urgência sem necessidade de medicação
2	Diarreia com necessidade de drogas parassimpatolíticas / descarga mucosa que não necessita de absorventes higiênicos / dor retal ou abdominal que necessite de analgésicos	Frequência de micção ou noctúria que seja menos frequente do que a cada hora. Disúria, urgência, espasmo da bexiga exigindo anestésico local
3	Diarreia que precise de suporte parenteral / descarga severa mucosa ou sanguínea que necessite de absorventes higiênicos / distensão abdominal (radiografia de placa plana demonstra alças intestinais distendidas)	Frequência com urgência e noctúria a cada hora ou mais frequentemente / disúria, dor na pelve ou espasmo da bexiga que requerem narcóticos regulares e frequentes / hematúria grosseira com ou sem passagem de coágulo
4	Obstrução aguda ou semiaguda, fístula ou perfuração; sangramento gastrointestinal que necessite de transfusão; dor abdominal ou tenesmo que necessitem de descompressão tubular para desvio do intestino	Hematúria que requer transfusão / obstrução aguda da bexiga não secundária à passagem de coágulo, ulceração ou necrose

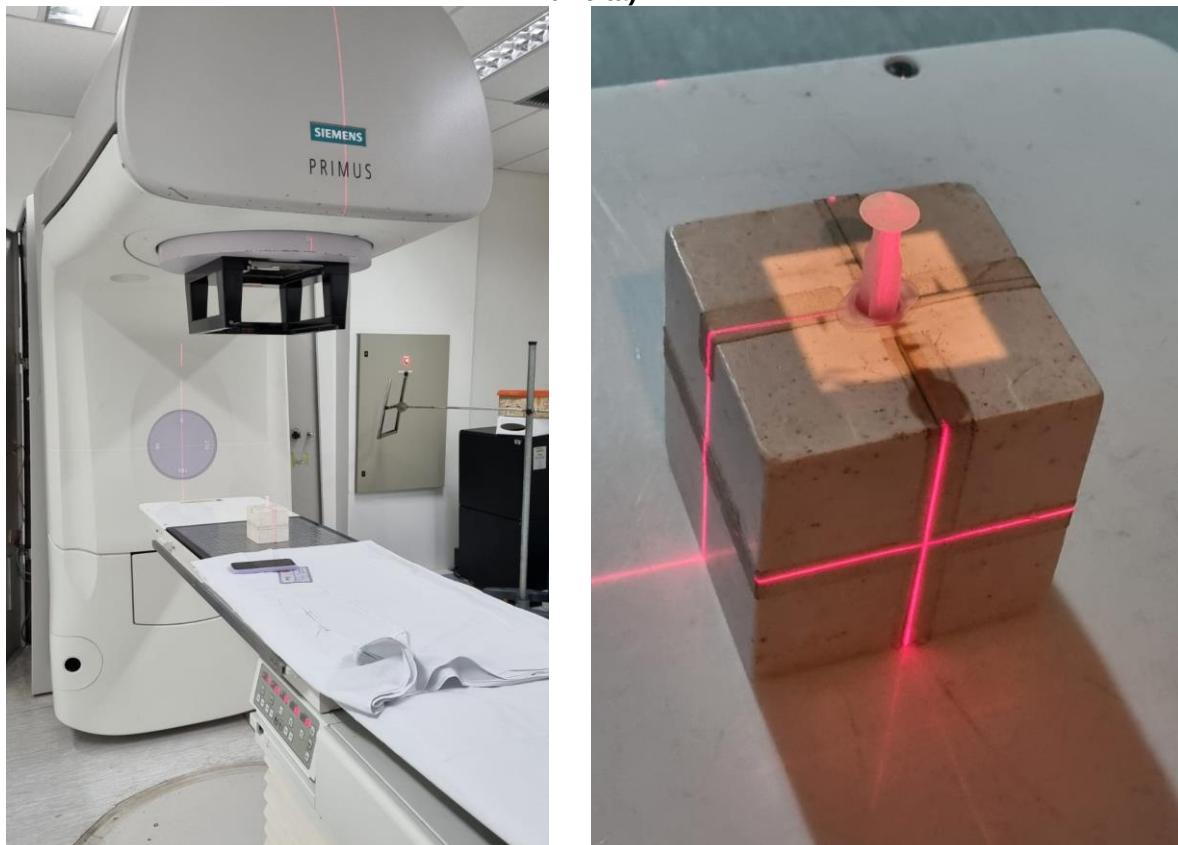
Fonte: Cox; Stetz; Pajak (1995).

2.2.3 Irradiação de amostras e ensaio de micronúcleos

Amostras de 9 mL de sangue periférico venoso foram coletadas de cada paciente em um momento anterior ao início da radioterapia. Cada amostra foi dividida em três alíquotas de 3 mL, das quais uma não recebeu nenhuma dose de radiação (controle), uma foi irradiada com 2,5 Gy e a outra com 4 Gy. Para as irradiações, as amostras foram acondicionadas em um bloco (phantom) feito de material com densidade semelhante à do tecido humano ($\rho = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$) e foram utilizados raios-x emitidos por um acelerador linear Siemens Primus (taxa de dose: 200 cGy.min^{-1} ;

Figura 2) pertencente ao Setor de Radioterapia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC).

Figura 2. Equipamento utilizado para radioterapia dos pacientes e irradiação das amostras de sangue (foto à esquerda); material a ser irradiado (sangue em seringa descartável) dentro de bloco (phantom) sendo alinhado no equipamento antes de iniciar a irradiação (foto à direita).



Fonte: o autor, 2024.

Em seguida, o material foi levado em recipiente térmico até o LAMBDA e mantido em banho-maria a 37°C por duas horas. Após esse tempo, as alíquotas de sangue foram transferidas para garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com Soro Fetal Bovino (10%) e Fitohemaglutinina (2%), seguido de acondicionamento em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂. Após 24 horas do início do experimento, Citocalasina B (150 µg.mL⁻¹) foi adicionada às culturas, as quais permaneceram na incubadora por mais 48 horas (International Atomic Energy Agency, 2011).

Ao fim do cultivo celular, as amostras foram tratadas com solução isotônica de NaCl (0,9%) e fixadas com uma solução de metanol : ácido acético (3:1). Em seguida, as lâminas foram confeccionadas e coradas com Giemsa 3% por 15 min (International

Atomic Energy Agency, 2011). Para a análise de micronúcleos em microscópio óptico (Leica DM E), foram seguidos os critérios recomendados por Fenech *et al.* (2003) a seguir:

Para as células binucleadas (BN):

1. As células devem conter dois núcleos;
2. Os dois núcleos em uma célula BN devem ter membranas nucleares intactas e estarem situados dentro do mesmo limite citoplasmático;
3. Os dois núcleos em uma célula BN devem ser aproximadamente iguais em tamanho, padrão de coloração e intensidade de coloração;
4. Os dois núcleos dentro de uma célula BN podem estar conectados por uma ponte nucleoplasmática fina, que não deve ser mais larga do que um quarto do maior diâmetro nuclear;
5. Os dois núcleos principais em uma célula BN podem se tocar, mas idealmente não devem se sobrepor. Uma célula com dois núcleos sobrepostos só pode ser pontuada se os limites nucleares de cada núcleo forem distinguíveis;
6. O limite citoplasmático ou membrana de uma célula binucleada deve estar intacto e claramente distinguível do limite citoplasmático das células adjacentes.

Para os micronúcleos (MN):

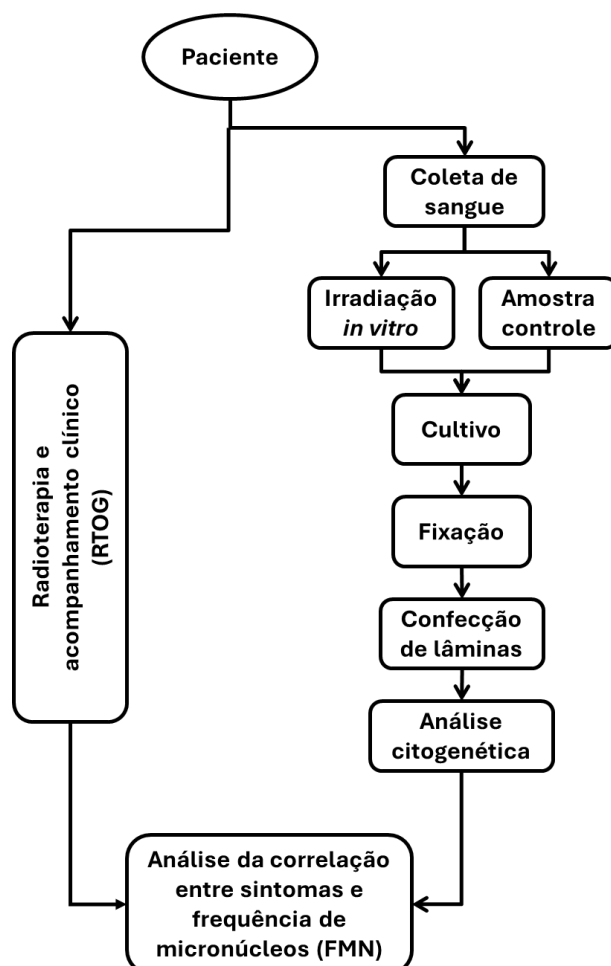
1. O diâmetro do MN em linfócitos humanos geralmente varia entre $1/16$ e $1/3$ do diâmetro médio dos núcleos principais, o que corresponde a $1/256$ e $1/9$ da área de um dos núcleos principais em uma célula BN, respectivamente;
2. Os MN são redondos ou ovais;
3. Os MN não são refrativos e, portanto, podem ser facilmente distinguidos de artefatos, como partículas de coloração;
4. Os MN não estão ligados ou conectados aos núcleos principais;
5. Os MN podem tocar, mas não sobrepor os núcleos principais, e o limite do micronúcleo deve ser distinguível do limite nuclear;
6. Os MN geralmente têm a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, podendo a coloração ser ocasionalmente mais intensa.

2.2.4 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software Bioestat 5.0, em que os dados foram inicialmente checados quanto à normalidade utilizando o teste de Lilliefors. O teste de correlação de Pearson foi empregado quando os dados obedeceram a uma distribuição normal. Quando os dados não apresentaram normalidade, empregou-se o teste de correlação de Spearman. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Na Figura 3 é apresentado um resumo esquemático da metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 3. Fluxograma metodológico. Etapas desenvolvidas nesta pesquisa.



Fonte: o autor, 2024.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões apresentados neste trabalho exploram a análise da radiosensibilidade de pacientes com câncer de próstata submetidos à radioterapia, utilizando a frequência de micronúcleos (FMN) como biomarcador preditivo. São abordados os efeitos adversos mais comuns observados nos sistemas geniturinário e gastrointestinal, correlacionando a severidade dos sintomas com a FMN obtida em doses crescentes de radiação. Além disso, são discutidas as implicações desses achados para a personalização do tratamento radioterápico, destacando o potencial dessa metodologia para otimizar a gestão da toxicidade radioinduzida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A análise inclui também as perspectivas para a validação do uso clínico desse biomarcador.

Ao todo, 15 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão foram encaminhados do setor de radioterapia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Nenhum destes se recusou a participar da pesquisa, contudo, não foi possível fazer a coleta de sangue em 5 deles visto que apresentaram veias de pouco calibre ou de difícil visualização e estabilização.

Dos 10 pacientes que tiveram amostras de sangue coletadas, um (CAP05) precisou ser internado por infecção urinária, o que comprometeu o acompanhamento clínico e por isso foi excluído das análises. Informações quanto à idade, estadiamento do câncer e tratamento de cada paciente podem ser observados na Tabela 2. As duas prostatectomias foram realizadas mais de 6 meses antes do início da radioterapia.

Tabela 2. Idade, estadiamento do câncer e tratamento desenvolvido para cada paciente analisado.

Paciente	Idade	Estad.	Prost.	TPA	Radioterapia		
					Sessões (Total)	Fração (Gy)	Σ Dose (Gy)
CAP01	66	II	Não	Não	28	2,5	70
CAP02	69	III	Não	Sim	36	2,0	72
CAP03	62	II	Sim	Não	26	2,5	65
CAP04	75	II	Não	Não	28	2,5	70
CAP06	63	II	Não	Não	28	2,5	70
CAP07	62	II	Não	Não	28	2,5	70
CAP08	73	II	Não	Não	28	2,5	70
CAP09	77	II	Não	Sim	28	2,5	70
CAP10	63	II	Sim	Sim	26	2,5	65

Estad.: estadiamento do câncer;

Prost.: prostatectomia (retirada cirúrgica da próstata);

TPA: terapia de privação androgênica;

ΣDose: dose acumulada.

Fonte: o autor, 2024.

Dos nove pacientes selecionados, seis apresentaram exatamente o mesmo número de sessões e dose por fração: 28 sessões de 2,5 Gy, totalizando 70 Gy de dose acumulada (Tabela 2). Um dos pacientes teve uma menor dose por fração (2 Gy) e um maior número de sessões (36), atingindo dose acumulada próxima (72 Gy). Dois pacientes passaram por 26 sessões de 2,5 Gy, totalizando 65 Gy.

Os sintomas e sua classificação RTOG apresentados pelos pacientes em cada avaliação podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4. Os efeitos adversos mais graves ocorreram no sistema geniturinário (GU), em que dois pacientes chegaram ao grau 2 (sintomas moderados que necessitam de intervenções locais, menores ou não invasivas) e dois ao grau 3 (sintomas severos ou medicamente significativos, mas que não representam um risco imediato à vida, para os quais hospitalização ou o prolongamento da hospitalização são indicados). No sistema gastrointestinal (GI), apenas um paciente chegou ao grau 2, enquanto cinco apresentaram no máximo grau 1 (sintomas leves, sem necessidade de intervenção) em algum momento do tratamento e três não apresentaram sintoma algum para este sistema durante a radioterapia.

Tabela 3. Sintomas apresentados nos sistemas geniturinário e gastrointestinal pelos pacientes na metade e ao final do tratamento radioterápico da próstata. Entre parênteses a classificação RTOG para o sintoma.

Paciente	Gastrointestinal		Geniturinário	
	Metade	Final	Metade	Final
CAP01	N/A	N/A	Nenhum	N/A
CAP02	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Freq. de micção aumentada (G2)
CAP03	Desconforto retal (G1)	Desconforto retal (G1)	Nenhum	Disúria (G1)
CAP04	Nenhum	Nenhum	Freq. de micção aumentada (G1)	Freq. de micção aumentada (G2)
CAP06	Diarreia leve (G1)	Diarreia leve (G1)	Freq. de micção aumentada (G1)	Disúria (G1)
CAP07	Diarreia e sangramento retal (G2)	Nenhum	Disúria e noctúria (G3)	Noctúria (G3)
CAP08	Desconforto retal (G1)	Diarreia leve (G1)	Disúria e noctúria (G2)	Freq. de micção aumentada e urgência (G3)
CAP09	Nenhum	Constipação (G1)	Freq. de micção aumentada (G1)	Noctúria (G1)
CAP10	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum

G1: grau 1; G2: grau 2; G3: grau 3.

Fonte: o autor, 2024.

Tabela 4. Classificação RTOG para os sintomas apresentados pelos pacientes nos sistemas geniturinário e gastrointestinal nas avaliações na metade (M) e final (F), e variação (∇) dos sintomas ao longo do tratamento radioterápico da próstata.

Paciente	Gastrointestinal			Geniturinário		
	M	F	∇	M	F	∇
CAP01	1	1	=	0	1	↑
CAP02	0	0	=	0	2	↑
CAP03	1	1	=	0	1	↑
CAP04	0	0	=	1	2	↑
CAP06	1	1	=	1	1	=
CAP07	2	0	↓	3	3	=
CAP08	1	1	=	2	3	↑
CAP09	0	1	↑	1	1	=
CAP10	0	0	=	0	0	=

M: metade do tratamento;
F: final do tratamento;
∇: variação da severidade dos sintomas ao longo do tratamento;
↑: aumento da severidade;
↓: diminuição da severidade;
=: manutenção da severidade.

Fonte: o autor, 2024.

O sintoma mais comum para o sistema geniturinário foi a frequência de micção aumentada, relatado por cinco pacientes. Para o sistema gastrointestinal, o desconforto retal foi o mais comum, sendo reportado por dois pacientes (Tabela 3). A severidade dos sintomas gastrointestinais se manteve estável na maioria dos pacientes, aumentando em apenas um e diminuindo em outro (Tabela 4). Para os sintomas geniturinários, a severidade dos sintomas aumentou em cinco pacientes, permanecendo estável nos outros quatro.

Na tabela 5 podem ser visualizadas a quantidade de células analisadas e a frequência de micronúcleos (FMN) encontrada por paciente para cada dose analisada (controle, 2,5 e 4 Gy). O paciente CAP07 foi o que apresentou as maiores frequências em todas as análises (Tabela 5), sendo também o que apresentou os sintomas GI e GU mais severos (Tabela 4).

Tabela 5. Quantidade de células analisadas e frequência de micronúcleos (FMN) encontrada por dose (controle, 2,5 e 4 Gy) para cada paciente.

Paciente	Controle		2,5 Gy		4,0 Gy	
	Céls	FMN	Céls	FMN	Céls	FMN
CAP01	511	0,0117	332	0,4970	168	0,9524
CAP02	316	0,0411	199	0,4171	186	1,0753
CAP03	505	0,0277	342	0,3830	254	0,9921
CAP04	509	0,0079	295	0,3966	228	0,7544
CAP06	476	0,0147	296	0,4324	198	1,2273
CAP07	400	0,1200	245	0,6898	186	1,3280
CAP08	495	0,0384	302	0,5861	203	0,9704
CAP09	536	0,0131	292	0,3801	207	0,7391
CAP10	522	0,0153	317	0,3565	200	0,9000

Céls – quantidade de células analisadas;

FMN – Frequência de micronúcleos.

Fonte: o autor, 2024.

O teste de normalidade foi empregado para avaliar a normalidade dos dados de FMN e das notas atribuídas aos sintomas de acordo com a escala RTOG, no sentido de avaliar qual o teste de correlação a ser aplicado. Para os casos de sintomas gastrointestinais, foi observado que apenas as FMN obedeceram a uma distribuição normal. Portanto, para esta situação, foi empregado o teste de correlação de Spearman, tanto na metade do tratamento quanto no final para ambas as doses analisadas (2,5 e 4,0 Gy).

A análise indicou correlação moderada significativa tanto para a dose de 2,5 Gy quanto para a dose de 4,0 Gy entre as FMN e os sintomas observados na metade

dos tratamentos (Tabela 6). Não foram encontradas correlações significativas entre os sintomas GI do final do tratamento e as FMN nas doses estudadas.

Tabela 6. Teste de correlação de Spearman para sintomas gastrointestinais (avaliados na metade e no final do tratamento) e frequência de micronúcleos de linfócitos irradiados com 2,5 e 4 Gy.

	2,5 Gy		4 Gy	
	Metade	Final	Metade	Final
Coeficiente de correlação (ρ)	0,7668	0,0866	0,6938	- 0,0866
p-valor	0,0159	0,8247	0,0381	0,8247

Nível de significância (α) = 0,05.

A correlação entre os sintomas GI e as FMN ter sido observada apenas na metade do tratamento pode indicar que os pacientes com maiores FMN apresentam sintomas GI mais graves do que os demais apenas nesta fase do tratamento, tornando-se indistinguíveis dos demais ao final do tratamento radioterápico. De fato, como pode ser visto na tabela 4, o paciente que teve as maiores FMN foi o que apresentou a maior severidade (grau 2) para sintomas GI na metade do tratamento, porém o quadro clínico do paciente modificou e foi para grau 0 na avaliação final.

Os dados de FMN e sintomas geniturinários (GU) seguiram uma distribuição normal, segundo o teste de Lilliefors. Desta forma, foi utilizado o teste de correlação de Pearson (tabela 7), que identificou uma correlação estatisticamente significativa entre os sintomas GU na metade ($r = 0,81199$, $r^2 = 0,6722$ e $p = 0,0068$) e no final do tratamento ($r = 0,7838$, $r^2 = 0,6144$ e $p = 0,0124$) para a FMN observada com a dose de 2,5 Gy. O coeficiente de correlação (r^2) mostrou que aproximadamente 67,22% da variabilidade nos sintomas GU na metade do tratamento e 61,44% no final podem ser explicados pela FMN para essa dose. Para a dose de 4 Gy, não houve evidências suficientes para concluir que a correlação foi estatisticamente significativa. A correlação entre os sintomas GU e a FMN somente para a dose 2,5 Gy demonstra que apenas esta dose foi eficaz em identificar os pacientes que foram mais sensíveis aos efeitos adversos da radiação sobre o sistema GU durante o tratamento radioterápico.

Tabela 7. Teste de correlação de Pearson para sintomas geniturinários (avaliados na metade e no final do tratamento) e frequência de micronúcleos de linfócitos irradiados com 2,5 e 4 Gy.

	2,5 Gy		4 Gy	
	Metade	Final	Metade	Final
r	0,8199	0,7838	0,4243	0,3532
r ²	0,6722	0,6144	0,1800	0,1248
(p)	0,0068	0,0124	0,2550	0,3510

Nível de significância (α) = 0,05.

Para ambos os sistemas (GI e GU), a dose de 2,5 Gy foi capaz de identificar os pacientes mais radiosensíveis. Por outro lado, a dose de 4 Gy permitiu essa identificação apenas para o sistema gastrointestinal (GI). Estabelecer a dose mais eficiente para a identificação dos pacientes com maior propensão a desenvolver os sintomas adversos mais severos é uma etapa fundamental na definição de biomarcadores de radiosensibilidade. Em um estudo anterior com câncer de próstata, foi observado que as doses ≥ 2 Gy foram eficazes em distinguir os pacientes com os sintomas mais severos (Lee *et al.*, 2003). Os resultados da presente pesquisa também corroboram com uma revisão recente que, analisando 9 trabalhos envolvendo micronúcleos e que encontraram um valor preditivo significativo deste biomarcador, observou que todos os estudos utilizaram doses entre 2 e 4 Gy (Vinnikov *et al.*, 2020).

A correlação entre o aumento da FMN com o aumento da severidade de sintomas na radioterapia encontrada no presente estudo também foi encontrada em outras pesquisas. Por exemplo, Silva *et al.* (2020) encontraram uma forte correlação ($r = 0,96$) entre a FMN e a severidade dos efeitos adversos agudos em mulheres com câncer de colo de útero. No estudo com câncer de próstata mencionado no parágrafo anterior, o grupo de pacientes que apresentou grau ≥ 2 de sintomas também teve FMN significativamente superior ao grupo de pacientes que apresentaram grau ≤ 1 (Lee *et al.*, 2003).

Essa correlação de aumento da FMN com o aumento dos efeitos adversos da radioterapia também foi observada para aberrações cromossômicas (cromossomos dicêntricos e/ou fragmentos) em câncer de próstata (Beaton *et al.*, 2013), mama (Borgmann *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2011), cabeça e pescoço (Borgmann *et al.*, 2002), entre outros (Vinnikov *et al.*, 2020). Essa correlação estar presente tanto com micronúcleos quanto com aberrações cromossômicas e ter o mesmo sentido em ambos corrobora com os resultados deste trabalho visto que os dois biomarcadores

possuem uma origem comum: quebras de fita dupla no DNA não reparadas ou reparadas incorretamente geradas pela radiação ionizante. Dessas quebras podem surgir os cromossomos dicêntricos e fragmentos acêntricos, que são visualizados durante a metáfase. Com a não-disjunção desses cromossomos e fragmentos até os polos do fuso mitótico durante telófase, pode-se formar um envelope nuclear ao redor desses cromossomos e fragmentos, que por sua vez se descondensam e assumem a morfologia de um núcleo interfásico, formando os micronúcleos (Fenech, 2000; Hall; Giaccia, 2018; Herate; Sabatier, 2020; International Atomic Energy Agency, 2011).

Compreender a relação entre a formação de MN, a radiosensibilidade individual e a severidade dos efeitos adversos da radioterapia é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de tratamento mais personalizadas e eficazes. A radiosensibilidade deve ser compreendida como um espectro largo e contínuo, indo do mais radiosensível ao mais radorresistente, dependente da interação de diversos genes e produtos gênicos e diversos processos celulares (Barnett *et al.*, 2015; Ruyscher *et al.*, 2019; Ferlazzo; Bourguignon; Foray, 2017). Sabendo-se que células com MN possuem uma mortalidade maior do que as sem MN (Guo *et al.*, 2019; Reimann; Stopper; Hintzsche, 2023), quanto maior a formação de MN, que ocorre em indivíduos mais radiosensíveis, espera-se que haja também um aumento da mortalidade celular.

A radioterapia expõe tanto o tecido tumoral quanto os tecidos saudáveis do entorno à radiação ionizante, causando quebras do DNA e ativando o sistema de reparo de dano do DNA. Consequentemente, variações na eficiência ou na fidelidade dos mecanismos de reposta ao dano do DNA podem afetar a sobrevivência celular e/ou a estabilidade genômica (Averbeck *et al.*, 2020). Com essa exposição, a lesão no tecido é causada tanto pela morte celular quanto pela inflamação radioinduzida. Morte celular e inflamações radioinduzidas podem causar efeitos adversos agudos que são transitórios na maioria das circunstâncias (Ruyscher *et al.*, 2019). Como esta inflamação é em parte causada pela morte celular induzida e pelo DNA lesionado, então pode-se deduzir que um aumento na mortalidade celular, como a causada pelo aumento da FMN, pode também levar a um aumento da inflamação, acentuando os efeitos adversos.

A avaliação da FMN pode auxiliar na identificação de pacientes mais suscetíveis a complicações e na otimização das doses de radiação, minimizando os danos aos tecidos sadios e maximizando a eficácia do tratamento. Uma vez que o

biomarcador seja validado, pacientes em risco elevado de efeitos adversos poderiam evitar completamente a radioterapia ou poderiam ser tomadas medidas adicionais para preservar os órgãos críticos e reduzir a toxicidade da radiação (Kerns *et al.*, 2023).

Porém, apenas uma pequena porção de pacientes pode ser considerada tão excepcionalmente radiosensível que evite completamente o tratamento. Para a maioria, uma pontuação de radiotoxicidade daria ao oncologista mais uma informação para orientar seu plano de tratamento (Kerns *et al.*, 2023). Com essa pontuação, seria possível projetar protocolos de radioterapia verdadeiramente adaptados, envolvendo técnica, esquema, volumes, dose e modalidades combinadas, e estabelecer um monitoramento mais frequente e um cuidado de suporte mais sistemático. A gestão das toxicidades radioinduzidas desde a fase inicial, através de cuidados de suporte e ajustes no tratamento, é fundamental para garantir a qualidade de vida dos pacientes (Pereira *et al.*, 2022).

2.4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram o potencial da análise de micronúcleos como ferramenta para a predição de radiosensibilidade individual em pacientes com câncer de próstata. Pacientes com maior frequência de micronúcleos terem apresentado também maior severidade dos efeitos colaterais radioinduzidos sugere que essa abordagem pode auxiliar numa maior personalização dos tratamentos radioterápicos, permitindo a identificação de pacientes com maior risco de desenvolver complicações e, conseqüentemente, a adoção de estratégias de prevenção e manejo mais adequadas.

Naturalmente, para que a análise de micronúcleos seja incorporada à prática clínica de forma rotineira, são necessários estudos adicionais com maior número de pacientes. A validação da associação entre a frequência de micronúcleos e a radiosensibilidade em diferentes populações de pacientes e tipos de tumores é fundamental para confirmar os resultados obtidos neste estudo e estabelecer a confiabilidade desse biomarcador.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que a análise de micronúcleos representa uma promissora estratégia para a otimização da radioterapia, com o potencial de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e

aumentar a eficácia do tratamento. Neste sentido, estudos adicionais, com um maior número de pacientes, são necessários para estabelecer a adequação e os limites da aplicabilidade da dosimetria biológica na avaliação de radiosensibilidade individual na radioterapia.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A presente tese abordou duas vertentes complementares da dosimetria biológica, unindo avanços metodológicos no ensaio com cromossomos dicêntricos e a aplicação prática do ensaio de micronúcleos na radioterapia do câncer de próstata. Os resultados obtidos destacam tanto a inovação técnica quanto o potencial de impacto clínico da dosimetria biológica.

No primeiro eixo de estudo, o uso do ensaio de micronúcleos mostrou-se promissor na predição de radiosensibilidade individual em pacientes com câncer de próstata. A correlação entre a frequência de micronúcleos e a severidade dos efeitos colaterais da radioterapia reforça o potencial deste biomarcador para personalizar tratamentos. A identificação precoce de pacientes com maior risco de complicações pode direcionar estratégias preventivas e de manejo mais eficazes, contribuindo para uma prática clínica mais segura e centrada no paciente. Contudo, para que essa abordagem se consolide, são necessários estudos adicionais com maior amostragem e protocolos padronizados, bem como validações em diferentes tipos de tumores.

Paralelamente, a extensão do tempo de cultivo para 72 horas no ensaio com cromossomos dicêntricos revelou-se uma estratégia eficaz para aumentar o índice mitótico de linfócitos irradiados, particularmente em doses altas, como 5 e 6 Gy. Essa modificação permitiu não apenas maior rendimento de metáfases da primeira divisão, como demonstrou que a curva de calibração convencional de 48 horas pode ser utilizada para a estimativa de doses nesse novo protocolo, embora seja recomendado estabelecer uma nova curva de calibração para o novo tempo de cultura. Assim, a metodologia otimizada representa um avanço significativo para aplicações em biodosimetria e avaliação de radiosensibilidade, aumentando a precisão e a robustez dos resultados.

A integração dessas duas abordagens evidencia a capacidade transformadora da dosimetria biológica, tanto na melhoria das técnicas laboratoriais quanto na sua aplicação clínica. Perspectivas futuras incluem um estudo em andamento com a otimização da concentração do Colcemid na metodologia de tempo estendido de cultura e a continuidade da avaliação da radiosensibilidade de pacientes com câncer de próstata até atingir a meta de 20 a 30 indivíduos analisados.

Dessa forma, este trabalho contribui para consolidar a dosimetria biológica como um pilar na medicina moderna, seja na avaliação de indivíduos expostos

acidentalmente à radiação, seja pelos impactos diretos na precisão do tratamento, na redução de efeitos adversos e na qualidade de vida dos pacientes. O avanço contínuo nessa área é essencial para transformar o potencial dessas metodologias em práticas de rotina que beneficiem a saúde pública e a medicina personalizada.

REFERÊNCIAS

- ADVISORY GROUP ON IONISING RADIATION. **Human Radiosensitivity**. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation. Londres: HEALTH PROTECTION AGENCY, 2013. 154p. Disponível em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/333058/RCE-21_v2_for_website.pdf . Acesso em 30 ago. 2024.
- AMARAL, A. *et al.* A New Methodology for Diagnosis of Fanconi Anemia Based on Biological Dosimetry. **Archives in Biosciences & Health**, v. 1, n. 2, p. 189–200, 2019.
- ATTARD, G. *et al.* Prostate cancer. **The Lancet**, v. 387, n. 10013, p. 70–82, 2016.
- AVERBECK, D. *et al.* Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 96, n. 3, p. 297–323, 2020.
- BALAKRISHNAN, S. *et al.* Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation (PCC) assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1–2, p. 11–16, 2010.
- BARNETT, G. C. *et al.* Incorporating Genetic Biomarkers into Predictive Models of Normal Tissue Toxicity. **Clinical Oncology**, v. 27, n. 10, p. 579–587, 2015.
- BEATON, L. A. *et al.* Chromosome Damage and Cell Proliferation Rates in In Vitro Irradiated Whole Blood as Markers of Late Radiation Toxicity After Radiation Therapy to the Prostate. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**, v. 85, n. 5, p. 1346–1352, 2013.
- BENDER, M. A.; GOOCH, P. C. Persistent Chromosome Aberrations in Irradiated Human Subjects. **Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 44, 1962.
- BENDER, M. A.; PRESCOTT, D. M. DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes. **Experimental Cell Research**, v. 27, n. 2, p. 221–229, 1962.
- BENJAMIN, L. C.; TREE, A. C.; DEARNALEY, D. P. The Role of Hypofractionated Radiotherapy in Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 19, n. 4, p. 1–9, 2017.
- BHATTACHARYYA, B. *et al.* Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 1, p. 155–183, 2008.
- BORGMANN, K. *et al.* Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: Fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. **Radiotherapy and Oncology**, v. 64, n. 2, p. 141–152, 2002.

BORGMANN, K. *et al.* Individual Radiosensitivity Measured With Lymphocytes May Predict the Risk of Acute Reaction After Radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 71, n. 1, p. 256–264, 2008.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.

BRENGUES, M. *et al.* T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 2, p. 119–127, 2017.

CASELLA, G. **Statistical Design**. New York, NY: Springer New York, 2008. (Springer Texts in Statistics).

CHAO, H. X. *et al.* Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. **Cell Systems**, v. 5, n. 5, p. 445–459.e5, 2017.

CHEN, Y. *et al.* Biological dose estimation for accidental supra-high dose gamma-ray exposure. **Radiation Measurements**, v. 46, n. 9, p. 837–841, 2011.

CHEN, D. Q.; ZHANG, C. Y. A simple and convenient method for gaining pure populations of lymphocytes at the first mitotic division in vitro. **Mutation Research Letters**, v. 282, n. 3, p. 227–229, 1992.

CHUA, M. L. K. *et al.* Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 99, n. 3, p. 362–366, 2011.

COX, J. D.; STETZ, J. A.; PAJAK, T. F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 31, n. 5, p. 1341–1346, 1995.

COZZARINI, C. *et al.* Multi-variable models predicting specific patient-reported acute urinary symptoms after radiotherapy for prostate cancer: Results of a cohort study. **Radiotherapy and Oncology**, v. 116, n. 2, p. 185–191, 2015.

DAL PRA, A.; SOUHAMI, L. Prostate cancer radiation therapy: A physician's perspective. **Physica Medica**, v. 32, n. 3, p. 438–445, 2016.

DEPERAS, J. *et al.* CABAS: A freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 124, n. 2, p. 115–123, 2007.

DERRICK, B. *et al.* Tests for equality of variances between two samples which contain both paired observations and independent observations. **Journal of Applied Quantitative Methods**, v. 13, n. 2, p. 36–47, 2018.

DÖRR, W. Radiobiology of tissue reactions. **Annals of the ICRP**, v. 44, p. 58–68,

2015.

DURDIK, M. *et al.* Assessment of Individual Radiosensitivity in Breast Cancer Patients Using a Combination of Biomolecular Markers. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2023.

EDWARDS, A. *et al.* Biological estimates of dose to inhabitants of Belarus and Ukraine following the Chernobyl accident. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 111, n. 2, p. 211–219, 2004.

FENECH, M. *et al.* HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. *et al.* Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FERLAZZO, M. L.; BOURGUIGNON, M.; FORAY, N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 27, n. 4, p. 310–315, 2017.

FERNANDES, T. S.; LOYD, D. C.; AMARAL, A. Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposure: A methodological improvement. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. SPECIALISSUE, p. 97–102, 2008.

FERREIRA-LUCENA, L. R. *et al.* Extending culture time to improve Mitotic Index for cytogenetic dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 100, n. 7, p. 1029–1040, 2024.

FIORINO, C. *et al.* Dose-volume effects for normal tissues in external radiotherapy: Pelvis. **Radiotherapy and Oncology**, v. 93, n. 2, p. 153–167, 2009.

FLORIAN, S.; MITCHISON, T. J. Anti-Microtubule Drugs. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1413, p. 403–21, 2016.

FORAY, N.; BOURGUIGNON, M.; HAMADA, N.. Individual response to ionizing radiation. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 369–386, 2016.

GIUSSANI, A. *et al.* Eurados review of retrospective dosimetry techniques for internal exposures to ionising radiation and their applications. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 59, n. 3, p. 357–387, 2020.

GRANZOTTO, A. *et al.* Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy

Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 94, n. 3, p. 450–460, 2016.

GRECO, C. *et al.* The evolving role of external beam radiotherapy in localized prostate cancer. **Seminars in Oncology**, v. 46, n. 3, p. 246–253, 2019.

GUO, X. *et al.* The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 779, n. November 2018, p. 1–35, 2019.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 8th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2018.

HAMSTRA, D. A. *et al.* Age and comorbid illness are associated with late rectal toxicity following dose-escalated radiation therapy for prostate cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 85, n. 5, p. 1246–1253, 2013.

HEIMERS, A. *et al.* Chromosome aberration analysis and the influence of mitotic delay after simulated partial-body exposure with high doses of sparsely and densely ionising radiation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 45, n. 1, p. 45–54, 2006.

HENEGARIU, O. *et al.* Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, v. 43, n. 2, p. 101–109, 2001.

HERATE, C.; SABATIER, L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108287, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Brasil. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Cytogenetic Dosimetry : Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies**. Vienna: IAEA, 2011.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency**. Vienna: IAEA, 2005.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Guidance for Medical Physicists Responding to a Nuclear or Radiological Emergency, Emergency Preparedness and Response**. Vienna: IAEA, 2020.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Manual for First Responders to a Radiological Emergency**. Vienna: IAEA, 2006.

KADDOUR, A. *et al.* Transmission of Induced Chromosomal Aberrations through Successive Mitotic Divisions in Human Lymphocytes after in Vitro and Vivo

Radiation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

KAMRAN, S. C.; LIGHT, J. O.; EFSTATHIOU, J. A. Proton versus photon-based radiation therapy for prostate cancer: emerging evidence and considerations in the era of value-based cancer care. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 22, n. 4, p. 509–521, 2019.

KANDA, R. *et al.* Effects of Colcemid Concentration on Chromosome Aberration Analysis in Human Lymphocytes. **Journal of Radiation Research**, v. 35, n. 1, p. 41–47, 1994.

KANDA, R.; HAYATA, I.; LLOYD, D. C. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 75, n. 4, p. 441–446, 1999.

KARACHRISTOU, I. *et al.* Biodosimetry for high-dose exposures based on dicentric analysis in lymphocytes released from the g2-block by caffeine. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 172, n. 1–3, p. 230–237, 2016.

KERNS, S. L. *et al.* Normal Tissue Toxicity Prediction: Clinical Translation on the Horizon. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 33, n. 3, p. 307–316, 2023.

KHVOSTUNOV, I. K. *et al.* A follow-up cytogenetic study of workers highly exposed inside the chernobyl sarcophagus. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 167, n. 4, p. 405–418, 2015.

KRISHNAJA, A. P.; SHARMA, N. K. Transmission of γ -ray-induced unstable chromosomal aberrations through successive mitotic divisions in human lymphocytes in vitro. **Mutagenesis**, v. 19, n. 4, p. 299–305, 2004.

KRUPINA, K.; GOGINASHVILI, A.; CLEVELAND, D. W. Causes and consequences of micronuclei. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 70, p. 91–99, 2021.

KULKA, U. *et al.* Biodosimetry and biodosimetry networks for managing radiation emergency. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 182, n. 1, p. 128–138, 2018.

LAMADRID, A. I. *et al.* PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. **Journal of Radiation Research**, v. 48, n. 1, p. 1–6, 2007.

LANDONI, V. *et al.* Predicting toxicity in radiotherapy for prostate cancer. **Physica Medica**, v. 32, n. 3, p. 521–532, 2016.

LEE, T. K. *et al.* Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 57, n. 1, p. 222–229, 2003.

LEE, W. R. *et al.* Randomized phase III noninferiority study comparing two radiotherapy fractionation schedules in patients with low-risk prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 20, p. 2325–2332, 2016.

LEMOS-PINTO, M. M. P. *et al.* A dose-response curve for biodosimetry from a 6 MV electron linear accelerator. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 10, p. 908–914, 2015.

MAZNIK, N. A. *et al.* Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators at Chernobyl. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 74, n. 1–2, p. 5–11, 1997.

MOHLER, J. L. *et al.* Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 5, p. 479–505, 2019.

MOISEENKO, V. *et al.* Biological dosimetry to assess risks of health effects in victims of radiation accidents: Thirty years after Chernobyl. **Radiotherapy and Oncology**, v. 119, n. 1, p. 1–4, 2016.

MOQUET, J. *et al.* Radiation biomarkers in large scale human health effects studies. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2020.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Prostate Cancer (Version 4.2024)**. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf. Acesso em: 01 nov. 2024.

PEREIRA, S. *et al.* The Normal, the Radiosensitive, and the Ataxic in the Era of Precision Radiotherapy: A Narrative Review. **Cancers**, v. 14, n. 24, p. 1–23, 2022.

PERNOT, E. *et al.* Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 2, p. 258–286, 2012.

PERRY, P.; WOLFF, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. **Nature**, v. 251, n. 5471, p. 156–158, 1974.

PINTO, M. M. P. L.; SANTOS, N. F. G.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 49, n. 4, p. 567–581, 2010.

PUJOL, M. *et al.* The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 149, n. 4, p. 392–398, 2012.

PURROTT, R. J.; VULPIS, N.; LLOYD, D. C. Chromosome Dosimetry: The Influence of Culture Media on the Proliferation of Irradiated and Unirradiated Human Lymphocytes. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 3, p. 203–208, 1981a.

PURROTT, R. J.; VULPIS, N.; LLOYD, D. C. The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation in vitro. **Experientia**, v. 37, n. 4, p. 407–408, 1981b.

PURROTT, R.J.; VULPIS, N.; LLOYD, D.C. The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocyte cell cycle induced by in vitro X-irradiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 69, n. 2, p. 275–282, 1980.

RANCATI, T. *et al.* Understanding Urinary Toxicity after Radiotherapy for Prostate Cancer: First Steps Forward. **Tumori Journal**, v. 103, n. 5, p. 395–404, 2017.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro–Wilk, Kolmogorov–Smirnov, Lilliefors and Anderson–Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.

REE, A. H.; REDALEN, K. R. Personalized radiotherapy: concepts, biomarkers and trial design. **The British Journal of Radiology**, v. 88, n. 1051, p. 20150009, 2015.

REIMANN, H.; STOPPER, H.; HINTZSCHE, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells after treatment of HeLa cells with different genotoxic agents. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 3, p. 875–889, 2023.

ROY, L. *et al.* Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield following gamma radiation exposure. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 151, n. 1, p. 135–143, 2012.

RUYSSCHER, D. *et al.* Radiotherapy toxicity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 13, 2019.

SAKAMOTO-HOJO, E. T. Lessons from the accident with ¹³⁷Cesium in Goiania, Brazil: Contributions to biological dosimetry in case of human exposure to ionizing radiation. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, n. May, p. 72–77, 2018.

SANTIVASI, W. L.; XIA, F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 2, p. 251–259, 2014.

SCULLY, R. *et al.* DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 11, p. 698–714, 2019.

SEEBER, A.; HAUER, M. H.; GASSER, S. M. Chromosome dynamics in response to DNA damage. **Annual Review of Genetics**, v. 52, p. 295–319, 2018.

SEVAN'KAEV, A. V. *et al.* A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 113, n. 2, p. 152–161, 2005.

SEVAN'KAEV, A. V.; LLOYD, D.; BRASELMAN, H. *et al.* A Survey of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Chernobyl Liquidators. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 58, n. 2, p. 85–91, 1995.

SEVAN'KAEV, A. V.; LLOYD, D.; EDWARDS, A. *et al.* High Exposures to Radiation

Received by Workers Inside the Chernobyl Sarcophagus. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 59, n. 2, p. 85–91, 1995.

SHALTIEL, I. A. *et al.* The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 4, p. 607–620, 2015.

SILVA, E. B. *et al.* Micronucleus assay for predicting side effects of radiotherapy for cervical cancer. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 96, n. 1, p. 60–66, 2021.

SUN, M. *et al.* A Simplified Calyculin A-Induced Premature Chromosome Condensation (PCC) Protocol for the Biodosimetric Analysis of High-Dose Exposure to Gamma Radiation. **Radiation Research**, v. 193, n. 6, p. 560–568, 2020.

VAN DEN BERG, J. *et al.* A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 19, p. 10132–10144, 2018.

VANDEVOORDE, C. *et al.* In vitro cellular radiosensitivity in relationship to late normal tissue reactions in breast cancer patients: a multi-endpoint case-control study. **International Journal of Radiation Biology**, v. 92, n. 12, p. 823–836, 2016.

VINNIKOV, V. A. *et al.* Limitations associated with analysis of cytogenetic data for biological dosimetry. **Radiation Research**, v. 174, n. 4, p. 403–414, 2010.

VINNIKOV, V. *et al.* Prediction of the acute or late radiation toxicity effects in radiotherapy patients using ex vivo induced biodosimetric markers: A review. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1–36, 2020.

VINNIKOV, V.; BELYAKOV, O. Clinical Applications of Biological Dosimetry in Patients Exposed to Low Dose Radiation Due to Radiological, Imaging or Nuclear Medicine Procedures. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 52, n. 2, p. 114–139, 2022.

VINNIKOV, V. A.; BELYAKOV, O. Radiation Exposure Biomarkers in the Practice of Medical Radiology: Cooperative Research and the Role of the International Atomic Energy Agency (IAEA) Biodosimetry/Radiobiology Laboratory. **Health Physics**, v. 119, n. 1, p. 83–94, 2020.

VINNIKOV, V. A.; MAZNYK, N. A. Cytogenetic dose-response in vitro for biological dosimetry after exposure to high doses of gamma-rays. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 154, n. 2, p. 186–197, 2013.

WATERMAN, D. P.; HABER, J. E.; SMOLKA, M. B. Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, n. 1, p. 103–133, 2020.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2018.

YAO, B. *et al.* Biological dose estimation for two severely exposed patients in a

radiation accident in Shandong Jining, China, in 2004. **International Journal of Radiation Biology**, v. 86, n. 9, p. 800–808, 2010.

APÊNDICE - EXTENDING CULTURE TIME TO IMPROVE MITOTIC INDEX FOR CYTOGENETIC DOSIMETRY¹

INTRODUCTION

Despite rigorous safety regulations on ionizing radiation (IR), actual or suspected accidental exposures have occurred with workers not wearing a dosimeter and the public at large. In such situations, physical dosimetry is not always straightforwardly achieved, and biological dosimetry (biodosimetry) has been proposed as either a complementary or an alternative method for dose assessment. Biodosimetry can also offer reliable estimates in the event of incorrect use or storage of dosimeters or serve as a validation tool in situations where there is an otherwise established dose estimate (Kulka *et al.*, 2018; Moiseenko *et al.*, 2016; Pinto; Santos; Amaral, 2010).

Biological Dosimetry (Biodosimetry)

Biological dosimetry encompasses individual dose evaluation methodologies based on biological endpoints induced by ionizing radiation (biomarkers). Since its development in the mid-1960s (Bender; Gooch, 1962), biological dosimetry has been applied as an alternative to physical dosimetry in many events involving suspected or actual radiation exposure (Sakamoto-Hojo, 2018). For example, in the reactor accident at Chornobyl, one of the best-known nuclear accidents, hundreds of persons were evaluated for radiation exposure, including evacuees and residents of the surrounding area, emergency and reactor workers, clean-up personnel, and those responsible for monitoring the 'sarcophagus' built around the ruins (Sevan'kaev, Lloyd, Braselmann, *et al.* 1995; Sevan'kaev, Lloyd, Edwards, *et al.* 1995; Maznik *et al.* 1997; Edwards *et al.* 2004; Sevan'kaev *et al.* 2005; Khvostunov *et al.* 2015; Moiseenko *et al.* 2016). The need to follow up victims of large-scale nuclear accidents (such as in Chornobyl) has driven the significant development of biodosimetric techniques, allowing the evaluation of both high and acute, or low and chronic, doses received by any group of people exposed in those events, even years after exposure (Herate; Sabatier, 2020).

¹ The Version of Record of this manuscript has been published and is available in the International Journal of Radiation Biology <https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2356545>

The importance of biological dosimetry goes beyond the measurement of absorbed dose. In accidental exposures, dose estimates can support the clinical management of exposed individuals and distinguish them from the non-exposed ones (the so-called ‘worried well’). Those estimates can also be relevant in counseling on the likelihood of radiation effects appearing years after exposure, such as radiation-induced cancer. In epidemiological studies, biodosimetry can provide radiation exposure estimates that can be correlated with the risk of developing late health consequences (Moquet *et al.*, 2020).

Furthermore, in radiotherapy, biodosimetric techniques have been proposed as tools to estimate the radiosensitivity of both the patient’s tumor and normal tissues and predict their response to the treatment, increasing the individual’s treatment precision and quality of life while minimizing the risks of complications (Vinnikov *et al.*, 2020; Vinnikov; Belyakov, 2020). In the diagnosis of Fanconi Anemia, a rare syndrome associated with chromosome fragility, a biodosimetric technique (dicentric chromosome assay, see below) using ionizing radiation has been proposed as an alternative to the traditional diagnostic test with diepoxybutane (DEB), which is a highly toxic clastogenic compound (Amaral *et al.*, 2019).

The assessment of biological indicators of exposure to IR is the cornerstone of biodosimetry. When IR interacts with a cell, the DNA is the target molecule from which the biological effects of radiation arise. The DNA molecule can be damaged by the direct transference of radiation energy or indirectly by highly toxic reactive species generated by the interaction of IR with other molecules in the cell. Radio-induced injuries trigger cellular mechanisms of damage recognition and repair, specific for each type of damage, that activate a cascade of enzymes, modifying gene expression, protein levels, and other aspects of the cell metabolism, such as the cell cycle and cell death. As a result, many products of those mechanisms have been studied as potential biomarkers of exposure to IR, but cytogenetic biomarkers remain the most sensitive and reliable biological endpoints used in cases of absorbed dose assessment (Averbeck *et al.*, 2020; Hall; Giaccia, 2018; Herate; Sabatier, 2020).

Cytogenetic Dosimetry

In cytogenetic dosimetry, the dicentric chromosome assay (DCA), the cytokinesis-block micronuclei (CBMN) assay, and the fluorescence in situ hybridization (FISH) translocation assay are the most frequently used techniques. The three of them are

based on scoring the frequency of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes (PBL), which are long-living circulating cells (T-lymphocytes with half-lives varying from a few weeks or months to 3.5 years or more). In addition, because those cells can reach all living tissues, they are considered ‘circulating dosimeters’, and can help differentiate whole-body from partial-body exposure to radiation (Giussani *et al.*, 2020; International Atomic Energy Agency, 2011).

The dicentric chromosome is an unstable chromosome-type aberration formed by the fusion of two chromosome segments, each with a centromere. They originate from double-strand breaks on the DNA molecule, followed by incorrect repair of those breaks by the cell. The frequency per cell of dicentrics scored in a blood sample is directly correlated to the average dose absorbed by the lymphocytes and can be used to estimate the absorbed dose of an individual (Herate; Sabatier, 2020; International Atomic Energy Agency, 2011).

For many reasons, the DCA is the gold standard in cytogenetic dosimetry for evaluating recent (< 3 months) acute IR exposure events. This assay has a high specificity for IR, with only a few clastogenic agents, such as bleomycin, neocarzinostatin, and mitomycin C, being able to produce a similar effect. Thus, there is a low confounding background occurrence of dicentric chromosomes in non-exposed populations (~1 per 1,000 cells). This results in a sensitive bioassay with a considerable range of dose detection, starting at 0.1 Gy for gamma and X-rays or 0.01 Gy for alpha particles and protons. Its staining reagents are generally low-cost, with Giemsa being the most frequently used. The addition of fluorescent probes to detect centromeres and telomeres can increase the speed and accuracy of the DCA, but it also raises its costs (Herate; Sabatier, 2020; Pinto; Santos; Amaral, 2010).

However, the DCA is a laborious technique that requires skilled and experienced technicians to score the chromosomes in many cells according to the dose absorbed (100 dicentrics for doses > 1 Gy; 500–1000 cells for doses < 1 Gy). This aspect results in significant additional time and costs associated with the analysis of aberrations, especially in the low dose range (Moquet *et al.*, 2020; Pernot *et al.*, 2012; Vinnikov; Belyakov, 2022). Furthermore, protracted, fractionated, and late exposures can lead to reduced numbers of chromosome aberrations, thus potentially decreasing the accuracy of the DCA, although calibrations can be made to minimize, to some extent, these confounders. (Pinto; Santos; Amaral, 2010; Vinnikov *et al.*, 2010).

Cell culture and cell cycle dynamics

According to the International Atomic Energy Agency publication on applications of cytogenetic dosimetry in preparedness for and response to radiation emergencies (2011), most laboratories incubate lymphocyte cultures for 48 hours, although it can vary from 46 to 52 hours. The IAEA advises laboratories to establish the ‘optimum time’ that routinely produces good yields of metaphases in their first division. The influence of various factors related to lymphocyte culture (e.g., culture medium and temperature, blood volume, Colcemid concentration, and culture duration) on metaphase yield has been observed in different studies (Kanda *et al.*, 1994; Purrott; Vulpis; Lloyd, 1981a; 1981b; Roy *et al.*, 2012). Thus, although the protocol for cell culture is more or less standardized between laboratories, variations in lymphocyte culture may lead to differences in the optimum time for fixation.

Studies on the length of lymphocyte culture have produced intriguing results. The first wave of mitosis starts at ~42 hours (Bender; Prescott, 1962). When the effects of different radiation doses (1-4 Gy) were studied, it was confirmed that irradiation delays cell proliferation, with each increase in dose leading to additional mitotic delay, regardless of culture medium (Purrott; Vulpis; Lloyd, 1981a, 1980). An intricate DNA repair mechanism controls this delay in the progression of the cell cycle, which is crucial to maintaining genomic stability and preventing the perpetuation of unrepaired and broken chromosomes (Scully *et al.*, 2019; van den Berg *et al.*, 2018; Waterman; Haber; Smolka, 2020). When the DNA is damaged, the cell activates elaborate signaling cascades known as DNA damage response (DDR), which are responsible for identifying DNA damage, coordinating DNA repair, and arresting cell-cycle progression in proliferating cells, allowing time for DNA repair (Shaltiel *et al.*, 2015).

DNA damage checkpoints are responsible for cell-cycle arrest, mediating the repair pathway choice, and preventing the cell from reaching mitosis until the damaged DNA is repaired (Seeber; Hauer; Gasser, 2018; Shaltiel *et al.*, 2015). When the cell-division process comes to a cell-cycle checkpoint, particularly at the G₁/S, G₂/M, and metaphase-anaphase transitions, it evaluates the genome integrity to determine whether it is fit for progression to division or requires additional time for DNA repair. If the repair is successful, the cell cycle advances. If the damage persists or is extensive, it can lead to cell death (apoptosis or mitotic catastrophe) or cellular senescence (Santivasi; Xia, 2014; Shaltiel *et al.*, 2015; Wenzel; Singh, 2018).

Assessment of elevated radiation doses

Assessment of high irradiation doses is a challenging task in cytogenetic dosimetry. Due to the high number of lesions induced in the DNA, a series of difficulties arise (Sun *et al.*, 2020; Vinnikov *et al.*, 2010; Vinnikov; Maznyk, 2013):

- (i) exposed individuals may present low numbers of lymphocytes in peripheral blood (lymphopenia);
- (ii) high rates of cell death (apoptosis);
- (iii) low metaphase quality and resolution of aberrations, and
- (iv) an increase in time needed to progress through the cell cycle.

As a result, the number of metaphases obtained can be minimal, leading to statistical uncertainty. A low metaphase number can also increase sample assessment time when scoring aberrations because the scorer might need more time scanning the slides for the metaphases. It could also require the analysis of more slides to achieve a significant number of scorable metaphases, which might require larger blood samples than the customary 5–10 mL, and to set up many more replicate lymphocyte cultures.

Different approaches have been proposed to overcome those limitations for high radiation doses. One of them is the premature chromosome condensation (PCC) assay, which uses okadaic acid or Calyculin A to induce the premature condensation of chromosomes and overcome the radio-induced cell-cycle arrest (Kanda; Hayata; Lloyd, 1999; Lamadrid *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2020). Another approach is the addition of caffeine to the lymphocyte culture, which releases cells arrested at the G2 checkpoint, allowing them to reach mitosis (Karachristou *et al.*, 2016; Pujol *et al.*, 2012).

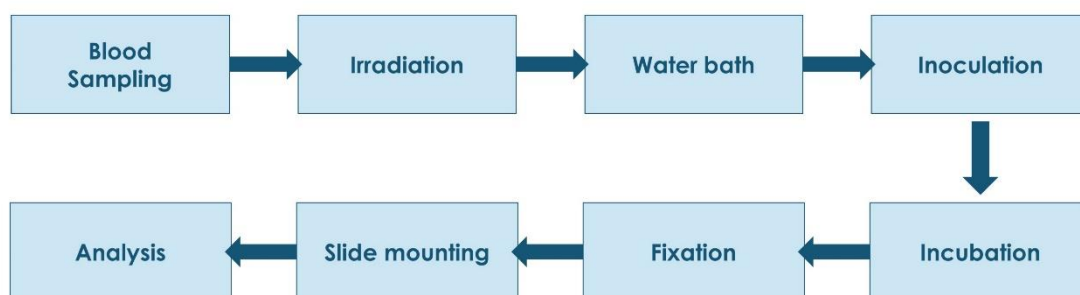
Because the classic DCA has been the most reliable and matured biodosimetric technique for the last decades, various studies have recognized the need to adjust the lymphocyte culture length to overcome those issues caused by high radiation doses (Balakrishnan *et al.*, 2010; Borgmann *et al.*, 2008; Vinnikov; Maznyk, 2013; Yao *et al.*, 2010). We believe, however, that very few studies have investigated the dynamics involving the metaphase yield with the extension of lymphocyte culture. In this context, our study aimed to analyze the effects of delaying DCA lymphocyte culture harvest time on the Mitotic Index, frequency of first-division cells, and dose estimation after irradiation of blood cells with various dose levels of ionizing radiation.

METHODS

This study involved two healthy non-smoker male volunteers (aged 58 and 44) with regular hemogram tests presenting normal results. This study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (registration number 2,838,697). Written informed consent was obtained from each donor. 9 mL of peripheral blood samples were drawn into sterile sodium-heparinized vacutainers. Each blood sample was divided into 2 mL microcentrifuge tubes, one kept unirradiated (control) and the others separately irradiated with 3, 5, and 6 Gy from a ^{60}Co Gammacell irradiator (average dose rate: 1.48 kGy.h^{-1}), at room temperature. The blood samples were placed into the irradiator within a PMMA (polymethylmethacrylate) sample-holder tube of appropriate thickness to ensure electronic equilibrium. The dose calibration of the Gammacell irradiator was performed by the Radiation Metrology Laboratory (DEN/UFPE) with a high-dose-rate ionization chamber (Model 10X5-0.18, Radcal Corporation, USA).

After irradiation, each aliquot remained in a 37°C water bath for two hours to promote DNA repair. Figure 1 summarizes the main steps of this procedure.

Figure 1. Flowchart of this study, from blood sampling to analysis of cells at a light microscope.



Cell culture process

Cell culture was prepared as recommended by the International Atomic Energy Agency (2011), with some modifications: 0.4 mL of whole blood from the aliquots was added to culture flasks, each containing 4 mL RPMI 1640 medium (Cultilab, Brazil), 0.5 mL fetal calf serum (Cultilab, Brazil), and 0.1 mL phytohemagglutinin (Gibco, USA). Colcemid (final concentration: $0.01 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich, United Kingdom) was added at the beginning of cell culture to achieve a higher metaphase yield at cell

harvest and at a low concentration to prevent excessive contraction of chromosomes. To identify first-division metaphase spreads, 30 μM BrdU (Sigma-Aldrich, Germany) was added to the medium. The flasks were incubated in a humidified 5% CO_2 incubator at 37 °C.

Cells were harvested at 48, 52, 68, or 72 hours to test the influence of extending culture length. After each cultivation period, cells were harvested according to the International Atomic Energy Agency (2011), with the following modifications: cell suspensions were centrifuged at 300g for 5 min, treated with a 75 mM hypotonic solution of potassium chloride at 37°C for 7 min in a water bath, and fixed with a methanol:acetic acid (3:1) solution. Slides were prepared according to Henegariu and co-workers (2001), with some modifications: after the slides were humidified in a hot-water bath (70 °C), three drops of the cell suspension were distributed on the slide with a 3-mL Pasteur pipette. Slides dried on a hot metal plate and then were kept in the dark at room temperature (~25 °C).

After 1-5 days of slide preparation, slides were stained by the *fluorescence plus Giemsa* technique, which differentially stains DNA strands that have incorporated BrdU molecules, producing the harlequin effect (Figure 2) in metaphases that have gone beyond the first mitotic division (International Atomic Energy Agency, 2011; Perry; Wolff, 1974). FPG staining was performed according to the International Atomic Energy Agency (2011), with some modifications. Initially, slides were kept in a Hoescht 33258 solution ($0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) for 20 min and then rinsed with distilled water. Slides were then placed on top of a surface covered with aluminum foil. Three drops of the same Hoescht solution were dropped onto each slide with a 3 mL Pasteur pipette and then covered with a coverslip. Slides were kept under UV light for 20 min. The coverslips were then removed by rinsing the slides with distilled water. Slides were finally stained by immersing them in a 3% Giemsa solution for 2.5 min and then rinsed with distilled water. Slides were air-dried at room temperature.

Figure 2. First-division (left) and second-division (right) metaphase spreads to illustrate the 'harlequin effect', a differential staining to distinguish cells that have divided at least once after the start of the culture. While first-division metaphase chromosomes have similar and intense staining on both chromatids, second-division ones have one chromatid that is much more intense in staining than the other.



Slide analysis

Slides were analyzed using a light microscope (Leica DM E, Germany), under 1000x magnification, following IAEA (2011) scoring criteria. 500 nuclei (either in metaphase or not) were counted for each slide, and three slides for each combination of dose and time were analyzed. Nuclei from polymorphonuclear cells, unstimulated cells, dead (or dying) cells, and micronuclei were excluded. Only nuclei from mitotic cells or stimulated cells were counted. First-division metaphase spreads had both chromatids with similar and intense staining, while second divisions had differential staining ('harlequin effect'; see Figure 2).

The Mitotic Index, which measures the cellular proliferation of a population of cells, was calculated as the number of metaphases (x 100) divided by the sum of the number of metaphases and stimulated cells (Eq. 01).

$$\text{Mitotic index} = \frac{M \times 100}{T_C} \quad (\text{Eq. 01})$$

$$\text{First division frequency} = \frac{M_1}{M} \quad (\text{Eq. 02})$$

$$\text{First Division Mitotic Index} = \frac{M_1 \times 100}{T_C - M_2} \quad (\text{Eq. 03})$$

Where: M : number of metaphases, M_1 : number of first division metaphases, M_2 : number of second division metaphases, T_C : number of analyzed cells.

The first-division frequency was calculated by dividing the number of first-division metaphases by the total of metaphases found (Eq. 02).

The Mitotic Index for first-division cells was calculated in the same way as the regular Mitotic Index, except that metaphases beyond the first division were excluded from the calculation (Eq. 03). Second (or later) division metaphases were collectively considered M₂ cells.

Dose estimation analysis

Cells irradiated with 5 and 6 Gy and cultivated for 48 and 72 hours were used to evaluate the consequences of extending culture time on dose estimation. For this task, cells from a single participant were used. First-division metaphases were scored according to the IAEA (2011) recommendations for a dicentric analysis. At least 50 cells or 30 dicentric chromosomes were scored per dose and length of culture as recommended by the IAEA Manual (2011). CABAS Software version 2.0 (Deperas *et al.*, 2007) was used to compute the estimated dose and the confidence interval. Estimations were conducted using a calibration curve obtained by our research group, derived from a 6-MV LINAC source operating at a dose rate of 0.54 Gy.min⁻¹. The established equation was $Y = (0.001 \pm 0.007) + (0.013 \pm 0.007)D + (0.056 \pm 0.004)D^2$, where “Y” represents the yield of radioinduced dicentrics and “D” is the related radiation dose (Lemos-Pinto *et al.*, 2015).

Statistics

The normality of data was evaluated with the Shapiro-Wilk test (Razali; Wah, 2011). A one-way ANOVA statistical test was performed to assess the significance of the differences between doses (control, 3, 5, and 6 Gy) at different time intervals (48, 52, 68, and 72 hours; Casella 2008). The homogeneity of variance was assessed using Levene’s test (Derrick *et al.*, 2018). For data not following a normal distribution, the Kruskal-Wallis non-parametric method was used to see if there were statistically significant differences between the groups regarding the medians.

RESULTS AND DISCUSSION

Mitotic Index (MI)

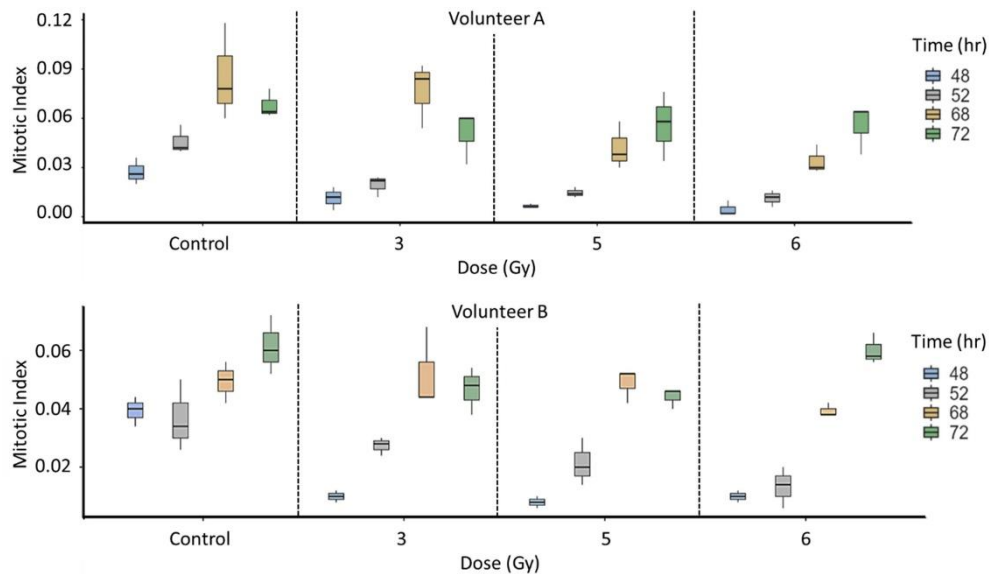
Table 1 and Figure 3 show MI found for each time point, absorbed dose, and volunteer. Overall, cells increased MI with the extension of culture length, while higher irradiation doses led to lower MI values.

Table 1. Mitotic Index of peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 52, 68, and 72 hours).

Volunteer	Culture time (h)	Mitotic Index ($\bar{X} \pm SD$)% [*]			
		Control	3 Gy	5 Gy	6 Gy
A	48	2.73 $\pm$ 0.81	1.13 $\pm$ 0.70	0.67 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.46
	52	4.60 $\pm$ 0.87	1.93 $\pm$ 0.64	1.47 $\pm$ 0.31	1.13 $\pm$ 0.50
	68	8.53 $\pm$ 2.97	7.67 $\pm$ 2.00	4.20 $\pm$ 1.44	3.40 $\pm$ 0.87
	72	6.80 $\pm$ 0.87	5.07 $\pm$ 1.62	5.60 $\pm$ 2.11	5.53 $\pm$ 1.50
B	48	3.93 $\pm$ 0.50	1.00 $\pm$ 0.20	0.80 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.20
	52	3.67 $\pm$ 1.22	2.73 $\pm$ 0.31	2.13 $\pm$ 0.81	1.33 $\pm$ 0.70
	68	4.93 $\pm$ 0.70	5.20 $\pm$ 1.39	4.87 $\pm$ 0.58	3.93 $\pm$ 0.23
	72	6.13 $\pm$ 1.01	4.67 $\pm$ 0.81	4.40 $\pm$ 0.35	6.00 $\pm$ 0.53

[*] Mean ($\bar{X}$) $\pm$ standard deviation (SD) from three replicates

Figure 3. Boxplot of Mitotic Index of peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 52, 68, and 72 hours).



Extending culture duration had a markedly positive impact on MI, especially when cells were irradiated with higher doses. For example, table 1 (column 6) shows that MI values for volunteer A increased almost twelvefold (from 0.47% to 5.53%) for cells exposed to 6 Gy. Both graphics in Figure 3 demonstrate that higher averages were achieved with extended cultivation, especially for irradiated cultures. The most pronounced increases were seen for the highest irradiation doses (5 and 6 Gy), which increased 5- to 12-fold (from $\leq 1\%$ at 48 hours to 4–6% at 72 hours).

Higher MI values mean a higher number of lymphocytes in mitosis relative to the total number of stimulated lymphocytes. The number of metaphase spreads is critical to any dicentric assay – a low number may interfere with the accuracy of the dose estimate, while too few of them can render the analysis unfeasible (Vinnikov; Maznyk, 2013).

Following high absorbed doses of IR, dicentric chromosome scoring can become severely impaired due to increased senescence, cell death, and extended cell-cycle arrest. Under these conditions, extending culture time has largely improved the number of metaphase spreads obtained. Some studies with elevated radiation doses (> 5 Gy) have reported that they found very few or no metaphases when irradiated cells were cultivated for 48 hours or that they had to extend the cell-culture duration to achieve a reasonable number of analyzable cells. For example, Borgmann *et al.* (2008) and Beaton *et al.* (2013) prolonged the culture length of irradiated lymphocytes to 72 h to achieve a sufficiently high number of metaphase cells when a 6 Gy dose of X-ray was delivered. Other studies have seen the same need for prolonging culture length when working with high doses of IR (Balakrishnan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2010).

Moreover, extending culture time to increase MI might also be helpful in studies involving blood samples of patients with low lymphocyte counts, either caused by their lifestyle or health condition. The IAEA (2011) also recommends prolonging the culture for those that might need longer cell-cycle times, e.g., the elderly and individuals exposed to high doses.

Frequency of First-Division Cells (M_1 cells)

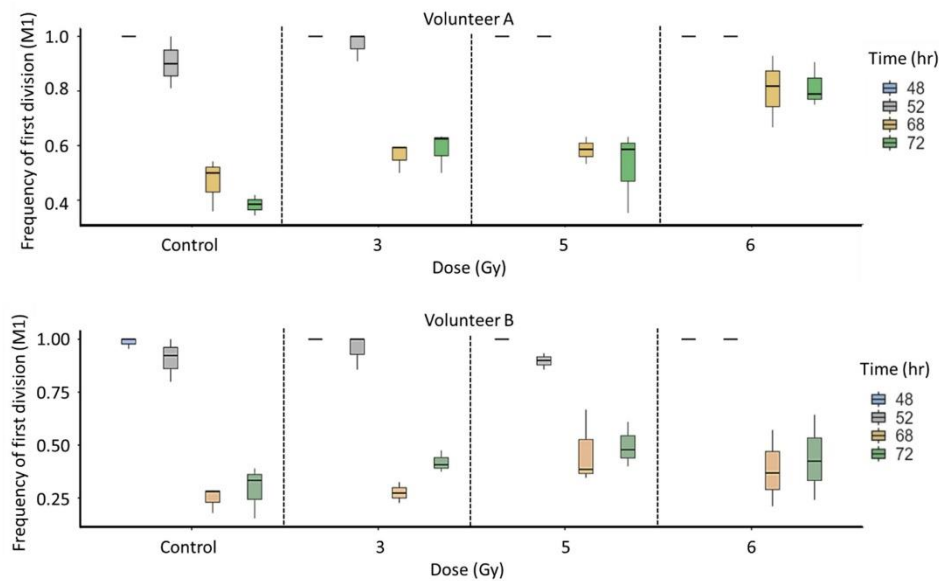
Table 2 and Figure 4 show the frequency of first-division cells for each time point, absorbed dose, and volunteer.

Table 2. Frequency of first-division (M_1) peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and after being irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 52, 68, and 72 hours).

Volunteer	Culture time (h)	Frequency of First-Division Cells ($\bar{X} \pm SD$)% [*]			
		Control	3 Gy	5 Gy	6 Gy
A	48	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
	52	90.3 $\pm$ 9.5	97.0 $\pm$ 5.3	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
	68	46.7 $\pm$ 9.6	56.3 $\pm$ 5.4	58.4 $\pm$ 5.0	80.5 $\pm$ 13.2
	72	38.3 $\pm$ 3.8	58.6 $\pm$ 7.5	52.4 $\pm$ 15.0	81.5 $\pm$ 8.1
B	48	98.5 $\pm$ 2.6	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
	52	90.8 $\pm$ 10.1	95.2 $\pm$ 8.3	89.7 $\pm$ 3.8	100.0 $\pm$ 0.0
	68	24.8 $\pm$ 6.0	27.5 $\pm$ 4.9	46.6 $\pm$ 17.5	38.3 $\pm$ 18.0
	72	29.2 $\pm$ 12.3	41.9 $\pm$ 5.1	49.6 $\pm$ 10.6	43.6 $\pm$ 20.1

[*] Mean ($\bar{X}$) $\pm$ standard deviation (SD) from three replicates

Figure 4. Boxplot of frequency of first-division peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and after being irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 52, 68, and 72 hours).



The frequency of first-division cells decreased with the extension of culture duration for all doses and both volunteers. All averages were greater than 98% at 48 h, which diminished to between 29% and 81% at 72 h (Table 2). Irradiated cells, on average, presented a higher frequency of M_1 cells than those not irradiated, which can be more easily seen when comparing the results of all doses after 72 hours of cultivation (Table 2 and Figure 4). This higher frequency of M_1 cells in irradiated cultures reflects the arrest in cell-cycle progress due to the lesions caused by IR.

Unstable chromosome aberrations, such as dicentrics, fragments, and rings, tend to decrease in frequency after every cell division, which can be ~50% for

dicentrics when passing from first to second mitotic division, although proximity between centromeres can alter this frequency (Kaddour *et al.*, 2017; Krishnaja; Sharma, 2004). Therefore, when scoring dicentric chromosomes beyond the first division, it is generally assumed that this loss of unstable aberrations can lead to an underestimation of dose or an imprecise dose-response correlation. Besides, it is widely accepted that the most reliable biological indicator of absorbed dose is the frequency of first-division dicentrics from peripheral blood lymphocytes (PBL), after *ex vivo* stimulation with phytohemagglutinin (Sun *et al.*, 2020). Consequently, to avoid taking into account second (or later) division cells, most protocols for dicentric chromosome assay (DCA) prescribe incubating lymphocyte cells for 48 hours, although it can vary from 46 to 52 hours between laboratories (International Atomic Energy Agency, 2011).

Our results corroborate that the presence of cells beyond first division is minimal at 48 h, even in conditions of non-irradiation. Beyond 48 h, the fluorescence plus Giemsa (FPG) staining might be necessary to distinguish M₂ cells and prevent their analysis because of their significant increase in relative numbers. As shown in Table 2, the frequency of M₂ cells reached as high as 10% at 52 h. However, cells irradiated with 6 Gy remained 100% M₁ at 52 h for both volunteers, which is expected due to the high dose level. As previously explained, the more IR a cell receives, the more DNA lesions it can develop. This activates the DNA damage response pathways and causes checkpoint arrest during the cell cycle that is correlated to the amount of damage to the DNA (Chao *et al.*, 2017; Purrott; Vulpis; Lloyd, 1980).

Purrott *et al.* (1980) were one of the first groups to report the effects of increasing absorbed radiation dose (up to 4 Gy) on the duration of cell cycles (up to the third cycle) of PBL. Beaton *et al.* (2013), working with prostate cancer patients, found that 6 Gy irradiated PBL from radiosensitive patients presented a lower proportion of M₂ cells at 72 h than the control group, indicating that they cycled more slowly. The authors argued that PBL from the radiosensitive group had more difficulty with cellular repair, needing more time to move through the cell cycle.

Moreover, the IAEA (2011) recommends FPG staining one or more replicate slides to check the M₁: M₂ ratio of any person under biodosimetric evaluation. Although the culture protocols aim to minimize the number of M₂ cells, differences among individuals in their lymphocytes' stimulation and proliferation capacity can lead to divergent cell-cycle progression rates.

Mitotic Index – only first-division cells (FDMI)

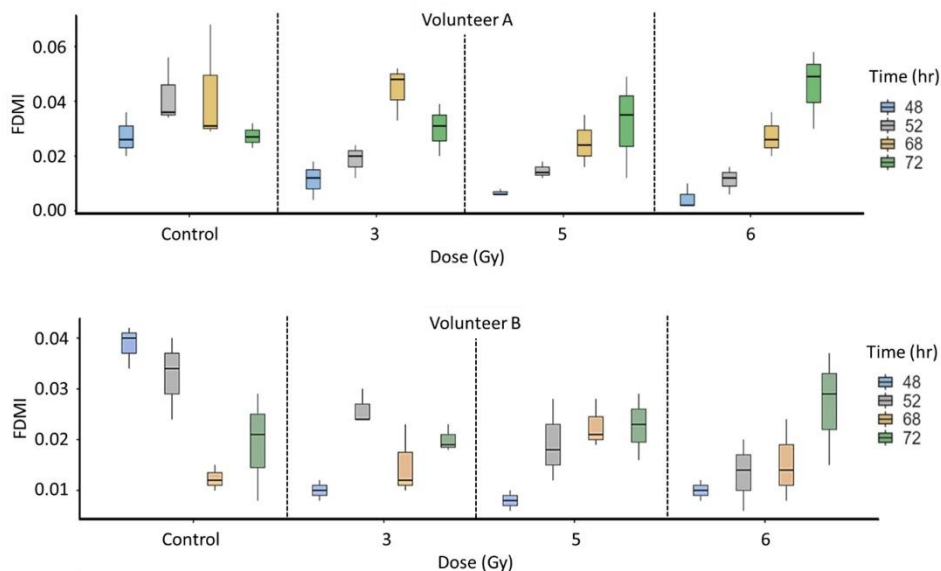
Table 3 and Figure 5 show the First-Division Mitotic Index for each time point, absorbed dose, and volunteer.

Table 3. First-Division Mitotic Index of peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 56, 68, and 72 hours). Metaphases that were not in the first division were excluded from the calculation.

Volunteer	Culture time (h)	First-Division Mitotic Index ($\bar{X} \pm SD$)% [*]			
		Control	3 Gy	5 Gy	6 Gy
A	48	2.73 $\pm$ 0.81	1.13 $\pm$ 0.70	0.67 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.46
	52	4.20 $\pm$ 1.22	1.87 $\pm$ 0.61	1.47 $\pm$ 0.31	1.13 $\pm$ 0.50
	68	4.27 $\pm$ 2.20	4.43 $\pm$ 1.00	2.50 $\pm$ 0.95	2.73 $\pm$ 0.81
	72	2.73 $\pm$ 0.45	3.00 $\pm$ 0.95	3.20 $\pm$ 1.87	4.57 $\pm$ 1.43
B	48	3.87 $\pm$ 0.42	1.00 $\pm$ 0.20	0.80 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.20
	52	3.27 $\pm$ 0.81	2.60 $\pm$ 0.35	1.93 $\pm$ 0.81	1.33 $\pm$ 0.70
	68	1.23 $\pm$ 0.25	1.50 $\pm$ 0.70	2.27 $\pm$ 0.47	1.53 $\pm$ 0.81
	72	1.93 $\pm$ 1.06	2.00 $\pm$ 0.27	2.27 $\pm$ 0.65	2.70 $\pm$ 1.11

[*] Mean ($\bar{X}$) $\pm$ standard deviation (SD) from three replicates

Figure 5. Boxplot of First-Division Mitotic Index of peripheral blood lymphocyte cells unirradiated (control) and irradiated with various doses (3, 5, and 6 Gy) and harvested at different times (48, 56, 68, and 72 hours). Metaphases that were not in the first division were excluded from the calculation.



Even though the Mitotic Index increased for all doses, the M₁:M₂ ratio of spreads altered markedly with the extension of culture, with an increase of M₂ cells in relative numbers. In other words, although there were more metaphases at later time points, they were not all in their first division (and the later the time point, the more metaphases in their second or later divisions could be found). As previously described, most

evaluations of unstable chromosome aberrations, such as the DCA, work with only M₁ metaphases to avoid underestimation due to their loss after each cell division. Therefore, we recalculated the MI by excluding all metaphases beyond their first mitosis.

The results showed that higher doses significantly increased First-Division Mitotic Index (FDMI) values when harvest time was expanded from 48 to 72 hours, growing almost tenfold for volunteer A: from 0.47% to 4.57% for 6 Gy (Table 3). Thus, the extension of culture boosted the number of M₁ metaphases in lymphocytes irradiated with high doses. Lower doses also benefited from the extended culture time – FDMI increased between two and threefold at 3 Gy for both volunteers.

The maximum values of the FDMI appeared at different time points, depending on the absorbed dose level. Cells irradiated with 5 or 6 Gy had their highest FDMI at 72 hours, while those exposed to 3 Gy presented maximum values at 52 or 68 hours and then decreased slightly (Figure 5).

When analyzing unstable chromosome aberrations, two features can be critical to the evaluation: (i) that you are working with first-division metaphases and (ii) that you have sufficient metaphases to analyze. Our results show that extending culture time can satisfy both requirements by increasing the M₁ metaphases, although creating a mix of M₁ and M₂ cells that requires some sorting techniques, such as FPG staining. In our experiments, cells irradiated with 6 Gy from volunteer A had an FDMI of only 0.47% at 48h, while non-irradiated cells had an FDMI of 2.73% (Table 3). However, when harvested at 72h, 6 Gy irradiated cells achieved 4.57% of FDMI, which means that, in relative terms, we would produce more M₁ metaphases than a non-irradiated culture in the 48-hour standard protocol.

Statistical results

Normality distribution tests showed that the only variable that followed a normal distribution was the Mitotic Index for cells in the first mitotic division (FDMI) for both volunteers (Shapiro-Wilk = 0.95; $p < 0.071$).

Effects of Colcemid

Besides the time of harvest and the amount of radiation received, Colcemid concentration and the moment of its addition to the culture can interfere with both MI and frequency of first-division metaphases. Colcemid (demecolcine), a synthetic

analog of Colchicine, is frequently used to arrest cells in mitosis for cytogenetic analyses. This molecule blocks cell division by disrupting microtubules, particularly spindle microtubules, which are more sensitive to it (Bhattacharyya *et al.*, 2008; Florian; Mitchison, 2016).

In most protocols for cytogenetic dosimetry, Colcemid is added 2 or 3 hours before harvesting the cells at a final concentration of $0.05\text{--}0.1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, to provide a sufficient number of metaphases without causing cell toxicity. In some cases, Colcemid is added at the beginning or 24 hours after the start of the culture to prevent cells from progressing beyond their first mitotic division, which can also improve MI. However, this early addition of Colcemid can lead to excessive contraction of chromosomes, so it is recommended to decrease its final concentration in the culture to about $0.05\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Chen; Zhang, 1992; International Atomic Energy Agency, 2011; Lemos-Pinto *et al.*, 2015).

On the other hand, too low concentration can result in poor Mitotic Index and fewer first division cells, even when added at the beginning of culture. Kanda *et al.* (1994) found very few metaphases after 48 h of culture in non-irradiated cultures with Colcemid concentration below $0.01\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, while at 0.025 and $0.05\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ the MI were 8 and 15%, respectively. The percentage of first-division metaphases was also influenced by the Colcemid concentration, being greater at $0.05\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (99.6%) than at $0.025\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (97.6%) after 48 hours of culture. After 54 hours, the relative number of first-division metaphases dropped slightly to 98.4% at $0.05\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, reaching 83.2% at $0.025\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Kanda *et al.*, 1994).

Therefore, the effect of the concentration and moment of addition of Colcemid are relevant factors that have undoubtedly influenced our results. We aimed to avoid excessive contraction while maintaining as many metaphases at the first division as possible. However, the low concentration of Colcemid ($0.01\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) probably has led to suboptimal MI and frequency of first-division metaphases. For this reason, optimizing these parameters is recommended.

Dose estimation analysis

Table 4 shows the dose estimation for cultures irradiated with 5 and 6 Gy and harvested after 48 and 72 hours of cultivation. Only M1 metaphases were scored for this analysis. Estimated doses were very close to the actual doses irradiated for both 48- and 72-hour cultures, differing only 0.1–0.3 Gy (representing 1.6–6.0% variation)

for cultures irradiated with 5 Gy. In addition, 72-hour cultures required only 1 slide each to provide more than 30 metaphase cells, while 48-hour cultures required at least 5 slides.

Table 4. Dose estimation for peripheral blood lymphocyte cells irradiated with 5 or 6 Gy and harvested at conventional (48 h) or extended (72 h) culture time. Only first-division metaphases were scored.

Delivered Dose (Gy)	Time (h)	Mcells	Slides	Dic	Freq. Dic	Estimated Dose	95% LCL (Gy)	95% UCL
5	48	33	5	51	1.55	5.14	4.42	5.91
5	72	38	1	63	1.66	5.32	4.65	6.04
6	48	38	8	78	2.11	6.02	5.34	6.74
6	72	34	1	73	2.15	6.08	5.37	6.83

Mcells: Metaphase cells; Slides: number of analyzed slides; Dic: dicentric chromosomes; Freq. Dic: frequency of dicentrics; LCL: Lower Control Limit; UCL: Upper Control Limit.

The IAEA Manual on Cytogenetic Dosimetry (2011) suggests an analysis of 500 cells or 100 dicentric chromosomes to deliver a dose estimate with reasonably low statistical uncertainty. If a mass casualty event occurs, however, the manual also indicates a triage mode that can precede a more accurate dose assessment with the scoring of 50 cells or 30 dicentric chromosomes, which provides dose estimates within a range of 1 Gy and increases throughput by a factor of 20 (International Atomic Energy Agency, 2011). Our analysis scored 51–78 dicentric chromosomes and achieved a relatively precise dose estimation, with up to 0.3 Gy in excess (Table 4). The confidence intervals also show no statistical difference between delivered and estimated doses. Our results provided further evidence of accuracy in dose estimation when scoring less than 100 dicentrics in triage mode. Nevertheless, due to the small number of cells per slide, our 48-hour cultures might not have had enough fixed cell suspension to achieve the 100 dicentric chromosomes recommended by the IAEA.

The number of scorable metaphases is a limiting factor that can result in inconclusive assessments if insufficient blood tissue is collected, adequately cultivated, and fixed. In situations of exposure to elevated doses (> 5 Gy), the MI is severely reduced in the conventional 48-hour protocol, as shown in tables 1 and 3. Thus, slides with low MI will present very few metaphase cells, requiring the analysis of more slides to achieve an adequate number of cells to assess the absorbed dose. The impact is evident in Table 4: whereas only one slide sufficed to accomplish more than 30 metaphases when irradiated cells cultivated for 72 hours, cells cultivated for 48 hours

following exposure to 5 and 6 Gy required five and eight slides, respectively, to attain a comparable number of scorable metaphases. More slides will also require more fixed material, which might not be feasible, and more time for slide preparation and staining. In cases of various people being accidentally exposed to IR, having to prepare and analyze more slides for each person can significantly slow down the process.

Apart from the duration of culture, the assessment of absorbed dose via dicentric dose-response curves is subject to numerous influencing factors. In cytogenetic dosimetry, dose estimation encounters potential challenges stemming from diverse individual exposure circumstances, including heterogeneous or homogeneous whole-body irradiation and critical parameters such as radiation quality, dose rate, and exposure duration. Thus, addressing these factors is indispensable to ensure the reliability and precision of dose estimates derived from dicentric yields in radiation dosimetry.

Implications for radiosensitivity and biodosimetric evaluations

There is evidence that irradiating blood samples with high doses (6 Gy) can achieve a better performance than with lower doses (3 Gy) at evaluating radiosensitivity and its correlation to acute adverse effects of radiotherapy (Borgmann *et al.*, 2008). Consequently, some studies already used an extended-duration protocol for radiosensitivity assessment with high radiation doses (Beaton *et al.*, 2013; Borgmann *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2011).

However, following events of accidental radiation exposure, the medical team will need rapid dose assessment to provide adequate care to affected victims, especially those moderately or severely exposed. The IAEA has various publications on how to act in nuclear or radiological emergencies (e.g., International Atomic Energy Agency 2005; 2006; 2011; 2020, to name a few). In this sense, once potentially exposed victims are identified, rapid triage scoring with cytogenetic assays (e.g., scoring 50 cells or 30 dicentric chromosomes, as previously mentioned) may be recommended to confirm the suspected exposure and determine the dose level. Although not remarkably accurate, those initial estimates are intended to verify the dose range each individual has been exposed to and make available timely information to the medical team (International Atomic Energy Agency, 2011).

After the triage phase, those individuals confirmed as having received substantial radiation doses can be further analyzed, and more accurate dose estimates

can be determined (International Atomic Energy Agency, 2011). Thus, when aiming to get a more precise dose estimate, a 72-hour culture protocol can provide many more scorable metaphases than the standard 48-hour protocol in cases of exposure to high doses (>5 Gy) without compromising the urgency for rapid triage sorting. As reported by some studies, there are cases where too few or no metaphase spreads are found without extending culture length (Balakrishnan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2010). The added time available for irradiated lymphocytes to reach mitosis can also improve the accuracy of dose estimation in cases of partial-body exposure (Fernandes; Loyd; Amaral, 2008; Heimers *et al.*, 2006).

To minimize delays in assessing suspected or actual accidental exposure to high levels, we suggest a laboratory culture of two sets of blood samples from an individual under investigation: one set would be fixed after 48 h culture and the other after 72 h. If too few metaphases were found in the 48-hour samples or if there were indications of significant partial-body irradiation, the 72-hour samples could be analyzed to provide a more accurate dose estimation.

Partial-body exposures are particularly interesting for biodosimetric evaluations because most radiation accidents do not involve exposures of the whole human body to ionizing radiation sources (Heimers *et al.*, 2006; Vinnikov *et al.*, 2010). In such cases, peripheral blood samples from exposed persons contain a mixture of irradiated and non-irradiated lymphocytes, and these irradiated cells may suffer from a significant mitotic delay during culture. Prolonging the culture allows these irradiated lymphocytes to reach mitosis, which has been demonstrated to improve the accuracy of dose estimation and decrease underestimation of cytogenetic damage, especially with doses ≥ 3 Gy for X-rays (Fernandes; Loyd; Amaral, 2008; Heimers *et al.*, 2006).

If any laboratory adopts an extended culture length protocol, one key element that would need re-adjustment is the dose-response curve (or calibration curve), an essential feature in biodosimetry that allows the assessment of absorbed dose from a suspected radiation-overexposed person. The calibration curve is built by matching the frequency of biological markers, such as dicentrics or micronuclei, to various doses (of a specific radiation quality) delivered to blood samples in *ex vivo* conditions. According to the International Atomic Energy Agency (2011), in its manual on cytogenetic dosimetry, calibration curves can vary from one laboratory to another due to variations in lymphocyte cultivation and slide preparation protocols, so each laboratory should establish its own calibration curve to avoid introducing extra uncertainty.

Conclusions

The extension of culture length to 72 hours significantly increased the Mitotic Index of irradiated lymphocytes compared with the conventional 48-hour protocol, especially after high absorbed doses (e.g., 5 and 6 Gy), when the metaphase yield can be too low for an adequate analysis. Although this time extension increased the number of cells beyond their first division, the number of first-division metaphase cells also increased, resulting in a much higher density of these cells at 72 hours than at 48 hours of culture. Although it is recommended to establish an appropriate dose-response calibration curve for the extended cultivation protocol, the dose estimation using the conventional 48-hour culture calibration curve proved suitable. The methodology proposed in this study can be an advantageous tool in enhancing the accuracy of the dicentric chromosome assay by boosting the metaphase yield of the lymphocyte culture, positively affecting various applications of this technique, such as biodosimetry and radiosensitivity evaluation.